UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**TERPENOS DE *WUNDERLICHIA CRULSIANA* E
MIKANIA SP. NOV.**

CECILIA VERONICA NÚÑEZ

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA:

Profa. Dra. NIDIA FRANCA ROQUE

SÃO PAULO

2000

"Terpenos de *Wunderlichia Crulsiana* e *Mikania* SP. Nov."

CECILIA VERONICA NÚÑEZ

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Orgânica.

Aprovada por:

Profa. Dra. NÍDIA FRANCA ROQUE

IQ - USP

(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. MASSAYOSHI YOSHIDA

IQ - USP

Profa. Dra. MARIA FÁTIMA DAS GRAÇAS FERNANDES DA SILVA

UFSCar

Profa. Dra. MAYSA FURLAN

IQ - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. FERNANDO BATISTA DA COSTA

FCFRP - USP

SÃO PAULO
19 DE MAIO DE 2000.

Dedico esta tese aos meus pais, Alicia e Rodolfo,
ao meu irmão, Leonardo,
ao Reinaldo
por estarem sempre ao meu lado, pelo apoio e
compreensão nos momentos difíceis.

AGRADEÇO

À FAPESP pela bolsa de estudos concedida.

B11 (hoje e ontem...): Ana Cristina, Ana Luísa, Ana Paula Danelutte, Ana Paula Santos, Angélica, Clara, Dulce, Ernani, Fernando, Isabel, João, Leandro, Luce, Luciana Retz, Mara, Marcos, Massayoshi, Massuo, Melânia, Nidia, Patricia, Paulo Benevides, Paulo Moreno, Roberto Carlos, Serginho, Sérgio Galdino.

B9: Pio Colepicolo, Patrícia, Alcely, Marcelo, Teresa, Heloísa, Keith, Edinailson, Sandra, Maisa Brigagão e Fabíola.

IB-SMA: Maria Claudia Marx Young.

Leiden: Anja Reltenburg-Looman.

B6: Jailton, Chico, funcionários da Secretaria de Pós-Graduação.

B0: Fernando, Adriana, Alessandra, Márcio e demais funcionários da Central Analítica.

À todos que de alguma forma me ajudaram a alcançar e vencer este desafio.

RESUMO

A presente tese relata o estudo químico de duas espécies vegetais pertencentes à família Asteraceae: *Mikania* sp. nov. e *Wunderlichia crulsiana*. Da espécie *Mikania* sp. nov. foram estudados os extratos diclorometânicos das folhas e dos galhos, tendo sido isolados e identificados sete ácidos diterpênicos; dos óleos voláteis das folhas e dos galhos foram identificadas vinte substâncias entre monoterpenos e sesquiterpenos. Da espécie *Wunderlichia crulsiana* foram estudados os extratos diclorometânicos das flores e dos galhos. Das flores foram isolados e identificados palmitatos e acetatos de triterpenoílas. Dos galhos foram isolados e identificados acetatos de triterpenoílas e triterpenonas e identificados por CG triterpenóis acetilados e palmitatos de triterpenoílas hidrolisados e posteriormente acetilados. Deste extrato foram também isolados e identificados três lactonas sesquiterpênicas e um sesquiterpeno. A identificação das substâncias foi realizada através de RMN de ^1H , de ^{13}C (BBD e DEPT 135 $^\circ$), CG/EM e co-injeção de padrões.

Os extratos brutos de ambas as plantas apresentaram discreta atividade, quando submetidos a um ensaio antifúngico. As frações, contendo os triterpenóis, acetatos e palmitatos de triterpenoílas e as lactonas sesquiterpênicas, foram testadas quanto à atividade anti-inflamatória mostrando-se bastante ativas. Tanto os extratos brutos quanto as frações supracitadas não se mostraram ativos em um ensaio antitumoral. Estes resultados indicam a seletividade da atividade dos extratos e frações, possivelmente não contendo substâncias citotóxicas.

ABSTRACT

This work describes the chemical study of two plants which belong to the family Asteraceae: *Mikania* sp. nov. and *Wunderlichia crulsiana*. The dichlorometane extracts from leaves and stems of *Mikania* sp. nov. we studied and seven diterpenic acids were isolated and identified. The volatile oil from leaves and stems of this plant were also studied and twenty substances among monoterpenes and sesquiterpenes were identified. From *Wunderlichia crulsiana* we analysed the dichlorometane extracts from flowers and stems. From flowers we isolated and identified triterpenes esterified with palmitic acid and acetic acid. From stems we isolated and identified triterpenes esterified with acetic acid and 3-oxo-triterpenes. By GC, we identified hydroxylated triterpenes that were acetylated, and triterpenes esterified with palmitic acid that were hydrolysed and acetylated. From stems we also isolated and identified three sesquiterpene lactones and a sesquiterpene. The compounds were identified by PMR, CMR (BBD and DEPT 135⁰), GC/MS and co-injection with authentic samples

The extracts of both plants showed low activity when submitted to bioassay with *Cladosporium sphaerospermum*. The fractions which contain the hydroxylated triterpenes, triterpenes esterified with acetic and palmitic acids and sesquiterpene lactones were submitted to anti-inflammatory bioassay and showed 42%, 29%, 29% and 47% of activity, respectively. The above mentioned extracts and the fractions did not show significant activity on the *Saccharomyces cerevisiae* bioassay, so there were not citotoxic substances in them.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

- CCDC: cromatografia em camada delgada comparativa;
- CCDP: cromatografia em camada delgada preparativa;
- CC: cromatografia em coluna;
- DCM: diclorometano;
- MeOH: metanol;
- ACN: acetonitrila;
- AcOEt: acetato de etila;
- hex: hexano;
- CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência;
- TR: tempo de retenção;
- R_f: fator de retenção;
- BBD: broad band decoupling;
- DEPT 135°: Distortionless enhancement by polarization transfer;
- *d*: dubleto;
- *dd*: duplo dubleto;
- *ddd*: duplo duplo dubleto;
- *dt*: duplo tripleto;
- *m*: multipeto;
- *s*: singleto;
- *sl*: singleto largo;
- *t*: tripleto;
- *J*: constante de acoplamento;
- δ : deslocamento químico em ppm;
- IDH: índice de deficiência de hidrogênio.

SUMÁRIO

	Página
Prefácio	1
Objetivos	3
 CAPÍTULO 1: As Plantas Estudadas	
1.1 Introdução	4
1.2 <i>Wunderlichia</i>	6
1.3 <i>Mikania</i>	10
1.4 Referências Bibliográficas	14
 CAPÍTULO 2: Estudos Químicos	
2.1 Introdução	16
PARTE EXPERIMENTAL	17
2.2 Técnicas de Extração Utilizadas	17
2.2.1 Arraste por Vapor d' Água	17
2.2.2 Extração por Solventes	17
2.3 Técnicas de Separação Utilizadas	18
2.3.1 Partição Líquido-líquido	18
2.3.2 Cromatografias de Adsorção em Coluna Aberta	19
2.3.3 Cromatografia de Exclusão em Coluna Aberta	21
2.3.4 Cromatografias de Adsorção em Coluna Fechada	22
2.3.5 Cromatografias em Camada Delgada Comparativa (CCDC)	
e Preparativa (CCDP)	23
2.4 Especificação de Equipamentos	24
2.5 Procedimentos Gerais	24
2.6 Extração, Separação e Purificação das Substâncias de <i>Wunderlichia</i> <i>crulsiana</i>	26
2.6.1 Coleta e Extração do Material Vegetal	26
2.6.2 Análise do Extrato Diclorometânico das Flores	26
2.6.3 Análise do Extrato Diclorometânico dos Galhos	27
2.6.4 Análise do Extrato Metanólico dos Galhos	30
2.7 Extração, Separação e Purificação das Substâncias de <i>Mikania</i> sp. nov.	31
2.7.1 Coleta e Extração do Material Vegetal	31
2.7.2 Análise do Extrato Diclorometânico das Folhas	32
2.7.3 Análise do Extrato Diclorometânico dos Galhos	34
2.7.4 Extração dos Óleos Voláteis	35
2.7.5 Análise dos Óleos Voláteis	36
2.8 Substâncias Isoladas de <i>Wunderlichia crulsiana</i> Triterpenos	37

Lactonas Sesquiterpênicas	40
Sesquiterpeno	40
2.9 Identificação das Substâncias Isoladas de <i>Wunderlichia crulsiana</i>	41
Triterpenos	41
Lactonas Sesquiterpênicas	55
Sesquiterpeno	61
2.10 Substâncias Isoladas de <i>Mikania</i> sp. nov.	63
Diterpenos	63
Sesquiterpenos	64
2.11 Identificação Das Substâncias Isoladas de <i>Mikania</i> sp. nov.	65
Diterpenos	66
Monoterpenos e sesquiterpenos do óleo volátil	73
2.12 Discussão	73
2.13 Referências Bibliográficas	75
 CAPÍTULO 3: Estudos Biológicos	
3.1 Introdução	152
Ensaio Antifúngico	154
Ensaio Anti-inflamatório	154
Ensaio Antitumoral	155
3.2 Parte Experimental	155
Ensaio Antifúngico	155
Ensaio Anti-inflamatório	156
Ensaio Antitumoral	157
3.3 Resultados	157
Ensaio Antifúngico	157
Ensaio Anti-inflamatório	158
Ensaio Antitumoral	159
3.4 Discussão	160
3.5 Referências Bibliográficas	161
CONSIDERAÇÕES FINAIS	163

SUMÁRIO DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1: Mapa da distribuição geográfica dos gêneros endêmicos de Asteraceae	6
Figura 1.2: Substâncias isoladas de <i>Wunderlichia mirabilis</i>	7
Figura 1.3: Fotografia de <i>Wunderlichia crulsiana</i> obtida no Morro do Pai Inácio	8
Figura 1.4: Substâncias isoladas de <i>Wunderlichia crulsiana</i>	9
Figura 1.5: Fotografia de <i>Mikania</i> sp. nov. obtida no Morro do Pai Inácio	11
Figura 2.1: Espectro de RMN de ^1H da fração W1.2	78
Figura 2.2: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W1.2	79
Figura 2.3: Espectro de RMN de ^1H da fração W1.3-4	80
Figura 2.4: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W1.3-4	81
Figura 2.5: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.11	82
Figura 2.6: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.11	83
Figura 2.7: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.16	84
Figura 2.8: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.16	85
Figura 2.9: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.15	86
Figura 2.10: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.15	87
Figura 2.11: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.10	88
Figura 2.12: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.10	89
Figura 2.13: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.17	90
Figura 2.14: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.17	91
Figura 2.15: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.9	92
Figura 2.16: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.9	93
Figura 2.17: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.12	94
Figura 2.18: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.12	95
Figura 2.19: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.19	96
Figura 2.20: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.19	97
Figura 2.21: Espectro de RMN de ^1H da fração W23.2	98
Figura 2.22: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W23.2	99
Figura 2.23: Espectro de RMN de ^1H da fração W23.4	100
Figura 2.24: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W23.4	101
Figura 2.25: Espectro de RMN de ^1H da fração W5.9-10	102
Figura 2.26: Espectro de RMN de ^1H da fração W17.9-13	103
Figura 2.27: Espectro de RMN de ^1H da fração W20.7	104
Figura 2.28: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W20.7	105
Figura 2.29: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W20.7	106
Figura 2.30: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W20.8	107
Figura 2.31: Espectro de RMN de ^1H da fração W21.7	108

Figura 2.32: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W21.7	109
Figura 2.33: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W21.7	110
Figura 2.34: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W21.7	111
Figura 2.35: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W21.7	112
Figura 2.36: Espectro de RMN de ^1H da fração W21.6	113
Figura 2.37: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W21.6	114
Figura 2.38: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W21.6	115
Figura 2.39: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W21.6	116
Figura 2.40: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W21.6	117
Figura 2.41: Espectro de RMN de ^1H da fração W9.1	118
Figura 2.42: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W9.1	119
Figura 2.43: Espectro de RMN de ^1H da fração M1.4-16	120
Figura 2.44: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M1.4-16	121
Figura 2.45: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M1.4-16	122
Figura 2.46: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M1.4-16	123
Figura 2.47: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração M1.4-16	124
Figura 2.48: Espectro de RMN de ^1H da fração M1.20-30	125
Figura 2.49: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M1.20-30	126
Figura 2.50: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M1.20-30	127
Figura 2.51: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M1.20-30	128
Figura 2.52: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração M1.20-30	129
Figura 2.53: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135 $^\circ$) da fração M1.20-30	130
Figura 2.54: Espectro de RMN de ^1H da fração M8.2	131
Figura 2.55: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M8.2	132
Figura 2.56: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração M8.2	133
Figura 2.57: Espectro de RMN de ^1H da fração M8.6-8	134
Figura 2.58: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M8.6-8	135
Figura 2.59: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M8.6-8	136
Figura 2.60: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração M8.6-8	137
Figura 2.61: Espectro de RMN de ^1H da fração M8.8	138
Figura 2.62: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M8.8	139
Figura 2.63: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M8.8	140
Figura 2.64: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração M8.8	141
Figura 2.65: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135 $^\circ$) da fração M8.8	142
Figura 2.66: Espectro de RMN de ^1H da fração M17.7-9	143
Figura 2.67: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M17.7-9	144
Figura 2.68: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M17.7-9	145
Figura 2.69: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M17.7-9	146
Figura 2.70: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração M17.7-9	147
Figura 2.71: Espectro de RMN de ^1H do óleo volátil das folhas de <i>Mikania</i> sp. nov.	148
Figura 2.72: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) do óleo volátil das folhas de <i>Mikania</i> sp. nov.	149

Figura 2.73: Cromatograma a gás do óleo volátil das folhas de <i>Mikania</i> sp. nov.	150
Figura 2.74: Cromatograma a gás do óleo volátil das folhas de <i>Mikania</i> sp. nov.	151
Figura 3.1: Ensaio antifúngico realizado com os extratos de <i>Wunderlichia crulsiana</i> e <i>Mikania</i> sp. nov.	158

SUMÁRIO DE TABELAS

	Página
Tabela 1.1: Espécies de <i>Mikania</i> estudadas quimicamente e as principais classes de terpenos encontradas	11
Tabela 1.2: Espécies de <i>Mikania</i> cujos óleos voláteis foram analisados quimicamente, com rendimento e classe química encontrada	13
Tabela 2.1: Substâncias identificadas nos óleos voláteis de <i>Mikania</i> sp. nov.	36
Tabela 2.2: Dados de RMN de ^{13}C para β -amirina, ácido 3-oxa-oleanólico e acetato de β -amirina-29-COOMe, obtidos da referência 6	44
Tabela 2.3: Efeitos α , β e γ provocados nos deslocamentos químicos dos carbonos 1, 2, 3, 4, 23, 24 e 25 pela oxidação do carbono 3	45
Tabela 2.4: Efeitos α , β e γ provocados nos deslocamentos químicos dos carbonos 1, 2, 3, 4, 23, 24 e 25 pela acetilação da hidroxila no carbono 3	45
Tabela 2.5: Dados de RMN de ^{13}C para o lupeol, 3-lupeona-30-hidroxi e os dados obtidos da análise dos efeitos α , β e γ provocados nos deslocamentos químicos dos carbonos 1, 2, 3, 4, 23 e 24 pela acetilação ou oxidação do carbono 3	47
Tabela 2.6: Dados de RMN de ^{13}C para o acetato de isoaglaína, acetato de isotirucalila e 5 e os dados obtidos da análise dos efeitos α , β e γ provocados nos deslocamentos químicos dos carbonos 1, 2, 3, 4, 23 e 24 pela oxidação do carbono 3	51
Tabela 2.7: Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 1 a 7, em CDCl_3 (125 MHz)	52
Tabela 2.8: Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 8 a 15, em CDCl_3 (125 MHz)	53
Tabela 2.9: TRs em CG dos triterpenos identificados do extrato diclorometânico dos galhos de <i>Wunderlichia crulsiana</i>	54
Tabela 2.10: TRs em CG das frações W17.9-13, W21.7, W21.6 e W20.7	55
Tabela 2.11: Dados de RMN de ^1H das substâncias 16, 17 e 18, em CDCl_3 (500 MHz)	60
Tabela 2.12: Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 16, 17 e 18, em CDCl_3 (75 MHz)	61
Tabela 2.13: Dados de RMN de ^{13}C da substância 19, em CDCl_3 (75 MHz)	

	62
Tabela 2.14: TRs em CG das substâncias 20 a 27	71
Tabela 2.15: Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 20 a 27, em CDCl_3 (125 MHz)	72
Tabela 3.1: Resultados obtidos com o ensaio anti-inflamatório	159
Tabela 3.2: Resultados obtidos com o ensaio antitumoral	160

SUMÁRIO DE FLUXOGRAMAS

	Página
Fluxograma 2.1: Estudo químico realizado com o extrato diclorometânico das flores de <i>Wunderlichia crulsiana</i>	26
Fluxograma 2.2: Estudo químico realizado com o extrato diclorometânico dos galhos de <i>Wunderlichia crulsiana</i>	29
Fluxograma 2.3: Estudo químico realizado com o extrato metanólico dos galhos de <i>Wunderlichia crulsiana</i>	30
Fluxograma 2.4: Estudo químico realizado com o extrato diclorometânico das folhas de <i>Mikania</i> sp. nov.	33
Fluxograma 2.1: Estudo químico realizado com o extrato diclorometânico dos galhos de <i>Mikania</i> sp. nov.	35

SUMÁRIO DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 2.1: Formação de 25 a partir de migrações de hidrogênio e grupos metílicos em um pimarano	68

INTRODUÇÃO GERAL

A humanidade, desde os seus primórdios, desejou conhecer a constituição da matéria. O estabelecimento das técnicas de análise elementar decorreu da busca da identidade do elemento a partir do qual tudo teria se originado. As primeiras explicações sobre a natureza da matéria eram apenas místicas, mas chegou um momento histórico no qual esse tipo de explicação não era suficiente. Assim surgiu a filosofia, tentando encontrar respostas racionais para os fenômenos naturais. A partir do século VII a.C. a filosofia ocupou-se fundamentalmente com a origem do mundo e as causas das transformações na Natureza. Os filósofos gregos pré-socráticos encontraram uma explicação racional e sistemática sobre a origem, ordem e transformação da Natureza. Cada filósofo, estudioso do assunto, considerava um elemento como o princípio eterno e imutável que estaria na origem da natureza e de suas transformações. Para Tales o princípio seria a água ou o úmido; para Anaximandro, o ilimitado e sem qualidades definidas; para Anaxímenes, o ar ou o frio; para Heráclito, o fogo¹.

Demócrito de Abdera foi o primeiro a propor a teoria do atomismo, pela qual a realidade do Ser e da Natureza seria constituída por átomos indivisíveis, as menores partículas da matéria. Os seres surgiriam por composição dos átomos, transformar-se-iam por novos arranjos desses mesmos e morreriam pela separação destes¹. Os átomos, para Demócrito, possuiriam formas e consistências diferentes (redondos, triangulares, lisos, duros, moles, rugosos, pontiagudos, etc.) e seriam essas diferenças e os diferentes modos de combinações entre eles que produziriam a variedade de seres, suas mudanças e desaparecimentos¹.

A partir dessa idéia original, muitas teorias foram discutidas, aceitas ou refutadas. Hoje sabe-se que o átomo não é indivisível, sendo formado por partículas subatômicas. Todos os átomos têm núcleo e eletrosfera e as diferentes composições destes dois últimos promovem a diversidade dos primeiros.

Contudo, a idéia inicial de átomo foi fundamental para as discussões posteriores no decorrer dos séculos.

Hoje em dia temos aparelhagens suficientemente desenvolvidas para descobrir quais átomos estão presentes nas moléculas e de que modo estão ligados uns aos outros. Mesmo com tantos avanços tecnológicos, ainda surpreende pensar que a simples organização desses átomos origina moléculas e que, entre outras coisas, estas proporcionam a continuidade da vida. Provoca perplexidade a constatação de que átomos de ferro possam formar simples dutos para escoamento ou estarem combinados na hemoglobina percorrendo nosso corpo, como substância indispensável à vida, cuja simples rarefação acarreta anemia.

Conseguir a vida eterna, ou no mínimo, prolongá-la ao máximo, sempre foi um dos objetivos do homem. Tendo o conhecimento e a tecnologia para determinar as estruturas das moléculas, precisamos de substâncias que sejam ativas contra as diversas doenças existentes, tanto humanas quanto vegetais e animais. Para conseguir isso, uma tendência atual é a busca de substâncias naturais bioativas. Essas substâncias podem ser usadas diretamente ou podem servir de modelos estruturais para modificações químicas, aumentando a atividade biológica. A tarefa de isolamento de substâncias, com todas as suas etapas, ainda é um desafio para nós, químicos de produtos naturais; principalmente no que refere ao isolamento de substâncias quando em misturas de polaridades semelhantes. As técnicas analíticas disponíveis têm que ser bem exploradas para que delas obtenhamos os melhores resultados. A presente tese aborda o uso de técnicas utilizadas na separação dos constituintes químicos dos extratos vegetais de duas espécies de Asteraceae.

Para melhor compreensão dos diferentes tópicos abordados, a tese foi dividida em três capítulos, sendo eles: “As Plantas Estudadas”, “Estudos Químicos” e “Estudos Biológicos”.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Chauí, M. (1998) Convite à Filosofia, Editora Ática.

OBJETIVOS

- ⇒ Estudo químico, visando o isolamento de substâncias de caráter terpênico, das espécies *Mikania sp.* e *Wunderlichia crulsiana*.
- ⇒ Contribuição à quimiotaxonomia do gênero *Mikania* e em particular da espécie *Mikania sp. nov.*
- ⇒ Desenvolvimento/adaptação de metodologias de separação de terpenos.
- ⇒ Bioensaios com as substâncias isoladas.

CAPÍTULO 1:

AS PLANTAS ESTUDADAS

1.1 INTRODUÇÃO

A importância do cerrado está além da sua extensão territorial. Devemos ressaltar a enorme diversidade biológica, o potencial em plantas medicinais, as espécies forrageiras nativas e as frutíferas. Apesar da aparente monotonia da vegetação, a flora do cerrado é de uma enorme riqueza¹. Em número de espécies, só perde para as florestas tropicais úmidas, como as da Amazônia e das matas costeiras². Lamentavelmente, ainda há relativamente poucos estudos fitoquímicos feitos com essas espécies. Este fato, aliado à grande devastação das áreas de ocorrência de cerrado levam a uma grande perda de conhecimento da biodiversidade.

Coletamos as duas plantas estudadas no Morro do Pai Inácio, localizado na Chapada Diamantina, estado da Bahia. A região é tropical, com duas estações definidas³, um inverno seco e um verão chuvoso. O tipo de vegetação está intimamente ligado ao tipo de solo. A acidez elevada do solo, baixa capacidade de troca catiônica e alta concentração do íon alumínio são algumas das características químicas que determinam a pobreza nutricional dos solos do cerrado, fato que foi confirmado no Morro do Pai Inácio¹. A flora nativa dos cerrados está adaptada a esses solos pobres. As plantas adquirem assim mecanismos eficientes que lhes permitem absorver os nutrientes essenciais para sobreviver².

O Morro do Pai Inácio, com seus 1000-1100 m de altitude, apresenta grandes diferenças de temperatura, geralmente com dias quentes e noites frias. Devido ao seu posicionamento soerguido, situado entre uma região que forma extenso vale e planalto, o vento é, em geral, intenso. Existem diversas nascentes na região, contribuindo para a umidade observada entre o Morro do Pai Inácio e a cidade de Lençóis. Nas primeiras horas do dia existe a constante presença de chuvas ou neblinas. Além disso, devido ao característico tipo de superfície e

relevo das rochas, encontrado principalmente no topo do Morro do Pai Inácio, é possível a permanência de água por mais tempo, concentrada em cavidades nas rochas¹.

A definição que adotaremos para o tipo de vegetação encontrada no Morro do Pai Inácio é “campos rupestres”, seguindo como referência a Dissertação de Mestrado de Abel Augusto Conceição¹.

As montanhas podem ser comparadas a “ilhas” separadas umas das outras por condições ecológicas muito diferentes que atuam como barreiras para migração de espécies. Elas são especialmente ricas em espécies endêmicas⁴. Considerando seu passado climático e geológico, as montanhas podem formar centros de concentração de biodiversidade, tornando-se locais de grande importância do ponto de vista da preservação ambiental¹.

Para serem quimicamente estudadas escolhemos duas espécies vegetais pertencentes à família Asteraceae. A primeira foi a *Wunderlichia crulsiana* pertencente à tribo Mutisieae e a segunda uma espécie nova de *Mikania* que pertence à tribo Eupatorieae.

Na figura 1.1, o mapa mundi mostra a distribuição geográfica dos gêneros endêmicos de Asteraceae⁵. Nele podemos observar a ocorrência, restrita ao Brasil, de *Wunderlichia*. O gênero *Mikania* é cosmopolita.

As plantas escolhidas para serem objeto de estudos químicos tiveram seus locais de coleta determinados por GPS (Global Position System) para que não houvesse dúvida com relação ao lugar exato de sua ocorrência. Também foram anotados a época do ano na qual foi realizada a coleta e se o espécimen estava em estado vegetativo ou não. Variações sazonais podem determinar a presença de substâncias bem diferentes, podendo essa diferença ser devida a fatores climáticos (temperatura, luminosidade, pluviosidade, etc.) ou ao fato de a planta estar em estado vegetativo ou florido, acarretando a produção de determinados metabólitos, seja para atrair polinizadores, seja para afastar herbívoros⁶.

Figura 1.1: Mapa da distribuição geográfica dos gêneros endêmicos de Asteraceae⁵.

1.2 *Wunderlichia*

O gênero *Wunderlichia* pertence à família Asteraceae, tribo Mutisiae. São descritas para este gênero, apenas as 6 espécies⁷, a seguir:

W. mirabilis Riedel ex Baker (sinonímia *W. tormentosa* Glaziov);

W. azulensis Maguire et Barroso nov. sp.;

W. crulsiana Taubert;

W. bahiensis Maguire et Barroso nov. sp.;

W. insignis Baillon (sinonímia *W. glaziouii* Baker);

W. senaeii Glaziov ex Maguire et Barroso.

A espécie *Wunderlichia mirabilis* foi estudada quimicamente⁸⁻¹⁰ e nela foram encontrados lactonas sesquiterpênicas, triterpenos e um poliacetileno (figura 1.2). A substância 1 foi descrita na referência 8, as substâncias 2 a 8, na referência 9 e as substâncias 9 a 20 na referência 10.

Figura 1.2: Substâncias isoladas de *Wunderlichia mirabilis*.

A espécie *Wunderlichia crulsiana* coletada no Morro do Pai Inácio, cujo estudo constitui parte desta tese, é formada de espécimens arbóreos, com cerca de 5 m de altura, flores amareladas e poucas folhas (figura 1.3). Sua ocorrência está restrita a campo rupestre e cerrado de altitude, entre rochas. Foi descrita em Goiás e é amplamente distribuída na Bahia¹¹.

Figura 1.3: Fotografia de *Wunderlichia crulsiana* obtida no Morro do Pai Inácio.

Um espécimen de *W. crulsiana* coletado em Goiás foi estudado quimicamente. Do extrato etanólico dos galhos dessa planta foram isolados quatro flavonóides e quatro triterpenos, tendo sido estes últimos também encontrados no presente estudo (figura 1.4)¹².

1

2

3

4

5 R = H

6 R = CH₃ 7 R₁ = H, R₂ = CO-CH=CH- 8 R₁ = R₂ = CO-CH=CH-

Figura 1.4: Substâncias isoladas de *Wunderlichia crulsiana*¹².

1.3 *Mikania*

O gênero *Mikania* possui mais de 450 espécies¹³ das quais, cerca de 10%, foram estudadas quimicamente. Na tabela 1.1, estão relacionadas as espécies de *Mikania* estudadas do ponto de vista químico e as duas principais classes de metabólitos secundários produzidos por elas (espécies que produzem principalmente lactonas sesquiterpênicas e aquelas que produzem diterpenos)¹³. Um fato notável é que as plantas coletadas no Brasil produzem preferencialmente diterpenos¹⁴.

A despeito da grande quantidade de óleo volátil extraída desta espécie de *Mikania* estudada por nós (vide seção 2.7.4), há poucos estudos realizados com óleos voláteis de *Mikania*. Apenas 10 espécies tiveram os seus óleos voláteis investigados. O rendimento do óleo volátil extraído assim como as suas principais classes químicas estão relacionadas na tabela 1.2.

A espécie de *Mikania* estudada por nós é nova e endêmica da região da Chapada Diamantina. Sua classificação está sendo feita pelo Dr. N. Hind no Jardim Botânico Real, Kew, em Londres, o qual nos autorizou a denominá-la de *Mikania* sp. nov. (pers. comm.). As plantas desta espécie são trepadeiras lenhosas, com flores alvas (figura 1.5). A região da Chapada Diamantina confirma a teoria de que montanhas são lugares propícios para a diferenciação de espécies, pois foram descritas mais de dez novas espécies de *Mikania* nessa região⁴.

Figura 1.5: Fotografia de *Mikania* sp. nov. obtida no Morro do Pai Inácio.

Tabela 1.1: Espécies de *Mikania* estudadas quimicamente e as principais classes de terpenos encontradas¹³.

Espécies Estudadas Quimicamente	Classe Química Encontrada		
	Lactonas sesquiterpênicas	Diterpenos	Outras
<i>M. alvimii</i>		x	
<i>M. arrojadoi</i>		x	
<i>M. banisteriae</i>	x	x	x
<i>M. batataefolia</i>	x		
<i>M. belemii</i>		x	
<i>M. congesta</i>	x	x	
<i>M. cordata</i>	x		
<i>M. cordifolia</i>	x		
<i>M. cynanchifolia</i>	x		
<i>M. dusenii</i>	x		
<i>M. glomerata</i>		x	
<i>M. goyazensis</i>	x	x	
<i>M. grazielae</i>	x		
<i>M. haenkeana</i>	x		

Cont.

Espécies Estudadas Quimicamente	Classe Química Encontrada		
	Lactonas sesquiterpênicas	Diterpenos	Outras
<i>M. hirsutissima</i>		x	
<i>M. hirsutissima</i> ¹⁵		x	
<i>M. laevigata</i>		x	
<i>M. lindbergii</i>		x	
<i>M. luetzelbergii</i>		x	
<i>M. mendocina</i>	x		
<i>M. micrantha</i>	x		
<i>M. microptera</i>	x		x
<i>M. minima</i>	x		
<i>M. monagasensis</i>		x	
<i>M. oblongifolia</i>		x	
<i>M. obtusata</i>		x	
<i>M. officinalis</i>		x	
<i>M. perplocifolia</i>	x	x	
<i>M. pohlii</i>	x		
<i>M. purpurascens</i>	x		
<i>M. pyramidata</i>		x	
<i>M. rimachii</i>	x		x
<i>M. saltensis</i>	x		x
<i>M. scandens</i>	x		
<i>M. sessilifolia</i>		x	
<i>M. shushunensis</i>			x
<i>M. smilacina</i>			x
<i>M. triangularis</i>		x	
<i>M. urticaefolia</i>	x	x	
<i>M. vitifolia</i>	x	x	
<i>M. vitifolia</i> ¹⁶		x	
<i>M. ypacarayensis</i>	x		

Tabela 1.2: Espécies de *Mikania* cujos óleos voláteis foram analisados quimicamente, com rendimento obtido e classe química encontrada.

Espécie	Rendimento	Monoterpenos	Sesquiterpenos	Referência
<i>M. micrantha</i>	0,80	pequena concentração	principalmente não oxigenados	17
<i>M. congesta</i>	0,2	pequena concentração	principalmente não oxigenados	18
<i>M. banisteriae</i>	0,1	monoterpenos não oxigenados	pequena concentração	18
<i>M. amara</i>	0,1	principalmente	aldeídos alifáticos	18
<i>M. hirsutissima</i>	0,82	pequena concentração	principalmente não oxigenados	19
<i>M. laevigata</i>	0,65	pequena concentração	principalmente não oxigenados	19
<i>M. involucrata</i>	0,12	pequena concentração	principalmente não oxigenados	19
<i>M. burchellii</i>	0,07	pequena concentração	principalmente não oxigenados	14
<i>M. glomerata</i>	0,07	pequena concentração	principalmente oxigenados	14
<i>M. hirsutissima</i>	0,82	pequena concentração	principalmente oxigenados	14
<i>M. micrantha</i>	0,09	mediana concentração	principalmente não oxigenados	14
<i>M. paranensis</i>	0,35	pequena concentração	principalmente não oxigenados	14

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Conceição, A.A. (1998) Estudo da Vegetação Rupestre no Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Palmeiras, Bahia, Brasil, Dissertação de Mestrado, Botânica, IB-USP.
2. "O Cerrado e a Ecologia do Fogo" Coutinho, L.M. (1990) *Ciência Hoje* 12, 68, 23-30.
3. Almanaque Abril (1999) 25ª Edição.133.
4. "Notes on the Compositae of Bahia, Brazil" (1993) *Kew Bulletin* 48, 2, 245-254.
5. Bremer, K. (1994) Asteraceae - Cladistics and Classification, Timber Press, 40.
6. Harborne, J.B. (1988) Introduction to Ecological Biochemistry, Academic Press, 1-116.
7. "A Review of the Genus *Wunderlichia* (Mutisiae, Compositae)" Barroso, G.M. and Maguire, B. (1973) *Revista Brasileira de Biologia* 33, 3, 379-406.
8. "A Lactone Analogue of Germacrone" Vichnewski, W. (1979) *Journal of Organic Chemistry*. 44, 14, 2575-2578.
9. "Modified Eudesmanolides and Other Sesquiterpene Lactones from *Wunderlichia mirabilis* and *Actinoseris polymorpha*" Bohlmann, F., Zdero, C., Robinson, H. and King, R. M. (1981) *Phytochemistry* 20, 7, 1631-1634.
10. "Neue Spirosesquiterpenlactone, Germacranolide und Eudesmanolide aus *Wunderlichia mirabilis*" Bohlmann, F., Ludwig, G.-W., Jakupovic, J., King, R.M. and Robinson, H. (1984) *Liebigs Annalen der Chemie*, 228-239.
11. Stannard, B.L., Harvey, Y.B. and Harley, R.M. (1995) Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina - Bahia, Brazil, Royal Botanic Gardens, Kew, 182-183.
12. "Chemical Study of *Wunderlichia crulsiana*" André, A.C.G.M. e Dias, D.A. (1999) *Bolletino Chimico Farmaceutico* 138, 2, LXV.
13. "Terpenoid Chemistry of *Mikania* Species" Herz, W. (1998) *Journal of Indian Chemical Society* 75, 559-564.

14. Limberger, R.P. (1998) Estudo de Óleos Voláteis de Espécies do Gênero *Mikania* (Asteraceae) e da Sub-Tribo *Myrtinae* (Myrtaceae) de Ocorrência no rio Grande do Sul, Dissertação de Mestrado, UFRGS, Departamento de Farmácia.
15. "Studies on the Constituents of *Mikania hirsutissima* (Compositae)" Ohkoshi, E., Makino, M. and Fujimoto, Y. (1999) *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 47, 10, 1436-1438.
16. "Kaurene Diterpenes from *Mikania vitifolia*" Lobitz, G.O., Tamayo-Castillo, G., Poveda, L. and Merfort, I. (1998) *Phytochemistry* 49, 3, 805-809.
17. "Essential Oil and Terpenoids of *Mikania micrantha*" Nicollier, G. and Thompson, G.C. (1981) *Phytochemistry* 20, 2587-2588.
18. "Essential Oils of Some Amazonian *Mikania* Species" Silva, M.L, Luz, A.I.R., Zoghbi, M.G.B., Ramos, L.S. and Maia, J.G.S. (1984) *Phytochemistry* 23, 2374-2376.
19. "Chemical Composition of Essential Oils from Three Southern Brazilian Species of *Mikania* (Asteraceae)" Limberger, R., Suyenaga, E.S., Henriques, A.T., Menut, C., Vérin, P., Lamaty, G. and Bessière, J.M. (1998) *Journal of Essential Oil Research* 10, 363-367.

CAPÍTULO 2:

ESTUDOS QUÍMICOS

2.1 INTRODUÇÃO

O avanço da tecnologia química tornou os métodos analíticos mais sensíveis. Atualmente é possível detectar substâncias em concentrações muito baixas; isto implica na necessidade de processos de separação cada vez mais eficientes, pois existe uma grande dificuldade de obter-se substâncias com o grau de pureza exigido por estes novos métodos analíticos. À medida que se avança na purificação das substâncias, as misturas são formadas por componentes de polaridades muito semelhantes o que dificulta a separação. Faz-se necessário, então, o emprego de diferentes técnicas de separação com o intuito de selecionar as mais adequadas à resolução do problema em questão. Em casos onde há diferença entre grupos funcionais (exemplo presença de hidroxila ou de carbonila) a CCDP é eficiente. Existem outros casos, como foi o da purificação de triterpenos com diferenças apenas na posição da ligação dupla ou na posição de grupos metílicos, nos quais a purificação é uma etapa extremamente complicada. A seguir, estão descritos os procedimentos experimentais realizados na tentativa de purificar as substâncias encontradas nos extratos das plantas estudadas.

PARTE EXPERIMENTAL

2.2 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO UTILIZADAS

2.2.1 ARRASTE POR VAPOR D'ÁGUA

Essa técnica permite a extração física do óleo volátil presente no tecido vegetal. A técnica consiste em aquecer água até a fervura em um balão conectado por um tubo de vidro a um aparelho tipo Clevenger, o qual contém o material a ser extraído. Esse material vegetal (folhas, galhos, etc.) deve ser fresco e fragmentado em pedaços bem pequenos para aumentar a superfície de contato.

2.2.2 EXTRAÇÃO POR SOLVENTES

O material vegetal (galhos, flores, folhas) foi seco em estufa a 50 °C por 3 dias e moído. Ao pó, colocado em um recipiente de vidro, foi adicionado diclorometano (quantidade suficiente para submergir o material e formar uma camada de aproximadamente 5 cm acima do material vegetal). A partir desse ponto, foram feitos dois tipos de extração. No primeiro, o material foi deixado em repouso, no escuro, por aproximadamente 7 dias. Terminado esse período, o material foi filtrado, e o material vegetal, recolocado em diclorometano e deixado em repouso, no escuro, por outros 7 dias. O filtrado foi concentrado em rotaevaporador e assim obteve-se o extrato concentrado. No segundo, após a adição do solvente, o recipiente foi colocado em ultra-som por 20 minutos, pelo menos 10 vezes. Nos dois processos de extração, realizaram-se 3 adições de solvente ou tantas quantas foram requeridas pela observação visual de material sendo extraído pelo solvente. O rendimento dos dois processos foi semelhante.

Após a extração com diclorometano, o material foi submetido à extração com metanol. Adicionou-se metanol suficiente para além de submergir o material, formar uma camada de aproximadamente 5 cm acima do material vegetal. Após o tempo de repouso ou de aplicação de ultra-som, por processo idêntico ao descrito no parágrafo anterior, o material é filtrado e o extrato concentrado. Normalmente 3 extrações foram suficientes para a extrair mais de 90 %.

2.3 TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO UTILIZADAS

2.3.1 PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Consiste em separar as substâncias de uma mistura em duas fases líquidas imiscíveis entre si¹.

Os tipos de partição empregados foram:

- a) o sistema hexano/(MeOH/H₂O 95:5) 1:1, usado nos extratos diclorometânicos para separar substâncias apolares de outras um pouco mais polares. Usa-se mistura de MeOH/H₂O para aumentar a imiscibilidade do MeOH em hexano.
- b) o sistema DCM/H₂O, usado nos extratos metanólicos, pois neste caso as substâncias são mais polares.
- c) o sistema n-BuOH/H₂O usando a fase aquosa obtida no item b. Esta partição foi realizada a fim de separar saponinas e flavonóides glicosilados presentes nos extratos de açúcares livres.
- d) o sistema ácido - base. Este sistema foi utilizado diretamente sobre o extrato diclorometânico. O sistema original, hexano/DCM/MeOH/NaOH 4% aq. 40:4:1:40, não permitiu extrair os ácidos diterpênicos presentes no extrato diclorometânico das folhas e dos galhos de *Mikania sp.*; sendo a função do DCM e do MeOH (modificadores²) de melhorar a solubilidade do agente extrator.

Assim, tentamos extrair com NaOH 10% aq., obtendo resultado satisfatório. A proporção usada foi idêntica: hexano/DCM/MeOH/NaOH 10% aq. de 40:4:1:40, alterando apenas a concentração da base.

2.3.2 CROMATOGRAFIAS DE ADSORÇÃO EM COLUNA ABERTA

a) sílica (SiO_2)

Os procedimentos cromatográficos foram realizados da seguinte forma:

As colunas abertas utilizando como fase estacionária sílica gel (63 - 210 mm, art. 7734 da Merck) foram empacotadas por via úmida, sempre evitando a formação de bolhas e rachaduras. Isto foi conseguido adicionando-se o primeiro eluente à sílica e aplicando-se o gel à coluna. A quantidade de sílica utilizada variou, mas a proporção de amostra/sílica manteve-se em torno de 1:80, para fracionamentos mais apurados. Para a primeira separação de um extrato usou-se a proporção de amostra/sílica 1:20. Utilizou-se coluna de vidro, com um algodão na extremidade inferior, em quantidade suficiente para que a sílica não escoasse. Uma vez empacotada, foi aplicada a amostra. A amostra foi dissolvida no menor volume possível do primeiro eluente (ordem crescente de polaridade). Quando isto não foi possível, dissolveu-se a amostra em pequena quantidade de solvente adequado, sendo adsorvida à pouca quantidade de sílica. Após aplicação da amostra, foi colocado um pedaço de algodão na extremidade superior do gel para evitar a agitação do material quando era adicionado o eluente.

b) sílica impregnada com AgNO_3

OBS: TODO O PROCEDIMENTO DE IMPREGNAÇÃO DEVE SER REALIZADO NO ESCURO.

A uma solução de AgNO_3 (3 g) em água (3 mL) e álcool etílico PA (47 mL) foram adicionadas gradualmente, e sob agitação, 20 g de sílica gel (63 - 210 mm),

mantendo-se a agitação por 15 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período, a mistura foi filtrada em funil com sucção e o excesso de solvente removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A sílica impregnada com AgNO_3 foi mantida em dessecador sob vácuo até o momento de ser usada.

A coluna à pressão ambiente usando como fase estacionária sílica gel impregnada com AgNO_3 foi empacotada por via úmida, seguindo os mesmos procedimentos que para a coluna aberta de sílica. A proporção de amostra/sílica com AgNO_3 usada foi de 1:100.

c) Florisil (Mg_2Si)

As colunas abertas utilizando Florisil com fase estacionária foram empacotadas por via úmida, como para sílica. A eluição segue a mesma ordem de polaridade da sílica, porém deve-se começar com um eluente um pouco menos polar do que o encontrado por CCDC. Isto é necessário uma vez que não é possível fazer CCDC de Florisil, e SiO_2 é mais polar que Mg_2Si . A proporção de amostra/Florisil usada foi de 1:100.

d) Amberlite XAD-2

A coluna aberta usando como fase estacionária Amberlite XAD-2 foi empacotada em MeOH 100%, ao qual foi adicionada H_2O em quantidades crescentes, até 100%. Após eluição de porções de H_2O equivalentes a dois volumes mortos, foi adicionada a amostra e iniciado o processo de separação. Os eluentes foram H_2O 100% e $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ com quantidades crescentes de MeOH até MeOH 100%. Utilizou-se uma proporção de amostra/Amberlite XAD-2 de 1:6.

e) Al_2O_3 ácida e neutra

Um dos testes realizados foi usando alumina ácida ($\text{pH}=5$). O modo de preparação é similar ao da sílica e a ordem de eluição também.

O outro teste foi com alumina neutra. Como essa alumina é mono hidratada, deixou-se ativando por 12 horas a 140 °C. O modo de preparação e a ordem de eluição são como os descritos para a sílica. Utilizaram-se proporções de amostra/ Al_2O_3 ácida e neutra de 1:200.

f) MgO/Celite

Foi utilizada uma mistura de 1:2 de MgO/Celite para o teste realizado. As partículas foram homogeneizadas a seco, por 2 horas. A coluna foi empacotada a seco e vácuo por 30 minutos (mínimo). Foram colocados de 1 a 2 cm de Na_2SO_4 anidro em cima da mistura. A proporção de amostra/(MgO/Celite) usada foi de 1:100.

2.3.3 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO EM COLUNA ABERTA

Sephadex LH-20

As colunas abertas utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 (25 - 100 mm da Pharmacia) foram empacotadas por via úmida, seguindo os mesmos procedimentos que para as colunas abertas de sílica. A Sephadex LH-20 também pode ser utilizada para separação por adsorção, mas em todos os casos relatados nesta tese, ela foi utilizada apenas para separar as substâncias por tamanho. Isto foi feito porque nem sempre a menor molécula é a mais polar. O eluente deve ser menos denso que a Sephadex LH-20 e deve-se deixá-la em contato com o eluente por um período mínimo de 4 horas. Isto torna-se necessário porque a Sephadex LH-20 aumenta de tamanho conforme o solvente. Com MeOH o aumento chega a 4 vezes o seu tamanho na forma seca. Além disto, sendo o fundamento da separação a diferença no tamanho das moléculas,

o fluxo da eluição é muito importante e deve estar entre 1,5 e 2,0 mL/min. A proporção de amostra/Sephadex LH-20 deve estar em torno de 1:70³.

2.3.4 CROMATOGRAFIAS DE ADSORÇÃO EM COLUNA FECHADA

a) rápida ou “flash”

As colunas sob pressão (tipo “flash”) foram empacotadas com sílica-60 da Merck (40 - 63 mm, art. 9385). O empacotamento é realizado a seco, sem pressão, com cuidado para que não fiquem camadas na coluna. Deve-se colocar algodão nas duas extremidades, uma vez que será aplicada pressão. A pressão ideal, obtida com N₂, está em torno de 0,5 lb e a proporção de amostra/sílica em torno de 1:60.

b) CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de UV foi utilizada para separar substâncias muito parecidas, como por exemplo, misturas de triterpenos com diferença apenas na posição da ligação dupla e grupo metílico. O espectro de UV da mistura inicial indicou uma absorção máxima em 201 nm. Nesse comprimento de onda, situam-se também as absorções da maioria dos solventes usados em CLAE. Poucos como ACN, MeOH e H₂O são transparentes nesse λ . A única coluna para CLAE que foi eficiente na separação foi Luna C-18 da marca Phenomenex, eluída com MeOH. Essa coluna apresenta a propriedade de ter todas as partículas completamente esféricas, permitindo, em princípio, um contato mais homogêneo entre substância/fase móvel/fase estacionária apresentando melhor resolução do cromatograma. Outro problema encontrado foi a dissolução da amostra. A amostra, contendo acetatos de triterpenoílas, não dissolveu em MeOH ou ACN. A solução encontrada foi

dissolvê-la em *n*-propanol e ir adicionando MeOH até quase 1:1 (ponto no qual a amostra começou a precipitar). Desta forma conseguimos dissolver consideravelmente a amostra sem interferir no desenvolvimento do cromatograma, fato que acontecia quando a amostra estava dissolvida apenas em *n*-propanol, devido ao volume de injeção ser de 500 μ l.

Re-cromatografia das frações mais puras, visualizadas em 210 nm, foram eluídas com ACN 100%. O tempo de eluição aumentou para 70 minutos, sendo que durante os primeiros 40 minutos não havia nenhuma substância eluindo da coluna; esse eluente puro foi reutilizado, uma vez que foram necessárias 20 eluições para obter massa suficiente dos triterpenos.

2.3.5 CROMATOGRAFIAS EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA (CCDC) E PREPARATIVA (CCDP)

Os procedimentos de preparação foram os seguintes:

- CCDC: adicionaram-se lentamente ~ 60 mL de água destilada à 30 g de sílica 60 da Merck (4 - 45 mm, art. 7731). Agitou-se com bastão de vidro até não existirem mais bolhas no interior do gel. Aplicou-se, com espalhador (graduado para espessura de camada de 0,5 mm), esta mistura às placas bem limpas e niveladas. Esperou-se secar a temperatura ambiente, sem vento, sendo depois ativadas em estufa a 120 °C por no mínimo 2 horas.
- CCDP: adicionaram-se ~ 150mL de água destilada à 60 g de sílica PF₂₅₄ da Merck (4 - 45 mm, art. 7747). Agitou-se com bastão de vidro até não existirem mais bolhas no interior do gel. Aplicou-se, com espalhador (graduado para espessura de camada de 1,0 mm), esta mistura às placas bem limpas e niveladas. Estas foram deixadas em local sem corrente de ar à temperatura ambiente, para secarem. Após estarem secas, foram ativadas em estufa a 120 °C por no mínimo 4 horas, antes de serem usadas.

2.4 ESPECIFICAÇÃO DE EQUIPAMENTOS

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados em espectrômetros Varian (300 e 75 MHz, respectivamente) e Bruker (500 e 125 MHz), utilizando como solventes CDCl_3 com TMS, CD_3OD , DMSO-d_6 .

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro INCOS 50 Finnigan-Mat (quadropolo) operado com impacto eletrônico (IE) a 70 eV, usado nas análises por CG/EM acoplado ao cromatógrafo 3400 Varian, coluna DB-5, 30 m e 0,25 mm x 0,25 mm de diâmetro interno.

As cromatografias a gás foram realizadas em aparelho Hewlett Packard 5890 Series II, com injetor automático HP 7673 e integrador HP 3396A, coluna capilar de 30 m, 5% de fenil em 95% metil-silicona. O gás de arraste foi o Hélio e o detector era por ionização em chama.

As cromatografias por CLAE foram realizadas em aparelho Shimadzu com detector de UV SPD-10AV, acoplado a um detector diode array SPD-M10AV, CBM-10A - Communications Bus Module.

Colunas usadas: Marca: Phenomenex

 Partícula: Luna C18 (2) 5 μ

 Dimensões: Analítica: 250 x 4,6 mm

 Semi-preparativa: 250 x 10,0 mm

 Pré-coluna: 4 x 3 mm (diâmetro interno)

 Partícula: C18 5 μ .

Os espectros de UV foram obtidos em aparelho Hitachi U-2000.

2.5 PROCEDIMENTOS GERAIS

Todo o processo de fracionamento foi monitorado através da análise das frações por CCDC. Adotou-se a sistemática de trabalhar inicialmente as frações mais puras quando analisadas por CCDC e RMN de ^1H . Na ausência de sinais característicos em RMN de ^1H de triglicerídeos (*dd* em δ 4,3, $J = 12$ e 4 Hz e *dd* em δ 4,12, $J = 12$ e 4 Hz) e de triterpenos esterificados com ácidos graxos (*sl* em δ 1,25 e *m* em δ 4,5) as amostras foram analisadas por CG.

2.6 EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS DE *WUNDERLICHIA CRULSIANA*

2.6.1 COLETA E EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal analisado foi um espécimen de *Wunderlichia crulsiana* coletado em 19 de setembro de 1998, por Nuñez, C. V e Cruz, F. G. - nº do coletor 004 - no Morro do Pai Inácio, localizado na Chapada Diamantina, estado da Bahia (S 12° 27' 326" e W 41° 28' 509"). Uma exsicata do material está depositada no herbário SPF do Instituto de Botânica da USP. O processo de obtenção dos extratos está descrito no item 2.2.2.

2.6.2 ANÁLISE DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO DAS FLORES

O extrato diclorometânico das flores foi submetido ao processo de fracionamento descrito no fluxograma 2.1.

Fluxograma 2.1: Estudo químico realizado com o extrato diclorometânico das flores de *W. crulsiana*.

OBS: As siglas utilizadas (exemplo W1.3-4) significam:

W = pertencente à planta *Wunderlichia crulsiana*

W1. = primeira coluna realizada com extrato de *Wunderlichia crulsiana*.

W1.3-4 = frações 3 e 4 reunidas da primeira coluna realizada com extrato de *Wunderlichia crulsiana*.

Os constituintes das frações W1.2 e W1.3-4 triterpenos 1 e 2 foram identificados em mistura seguindo a metodologia descrita na referência 2, por diferença na intensidade dos sinais dos espectros de RMN de ^{13}C (BBD). Do mesmo modo, as substâncias 3 e 4 apresentavam uma grande diferença de concentração e puderam ser identificadas em mistura.

Outras frações obtidas no fracionamento desse extrato apresentaram como constituintes principais triglicerídeos, esterificados com ácidos graxos insaturados, e não foram detectados flavonóides, através de CCDC revelada com NH_4OH , nesse extrato.

2.6.3 ANÁLISE DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO DOS GALHOS

O extrato diclorometânico dos galhos de *W. crulsiana* foi submetido aos processos de separação sumariados no fluxograma 2.2.

Neste extrato, encontramos a seqüência de triterpenos esterificados na posição 3 com ácidos graxos (W5.1), triterpenos acetilados na posição 3 (W5.2) e triterpenos hidroxilados na posição 3. Antes de optar pelo fracionamento por CLAE, as frações W9.3 e W9.4 foram submetidas a vários procedimentos cromatográficos, alguns deles pouco utilizados, a fim de encontrarmos algum que separasse seus constituintes. Porém, as tentativas não foram satisfatórias pois as diferenças estruturais nas moléculas da mistura eram muito pequenas. Desta forma, submetemos a fração W5.2 à CLAE. Diversas colunas de fase reversa foram testadas antes de conseguirmos a C-18 Luna, Phenomenex, cedida por empréstimo pelo Ernani Pinto Jr. (aluno de pós-graduação, orientado do Prof. Dr. Pio Colepicolo, Departamento de Bioquímica, IQ-USP). Essa foi a única que permitiu a separação de moléculas tão semelhantes. Colunas de fase normal não foram testadas devido ao fato dos solventes necessários (DCM, AcOEt) não serem transparentes a 201 nm. A fim de saber quais eram os constituintes das outras frações, a fração W5.1 foi submetida à hidrólise básica e depois acetilada. A fração W5.4 foi acetilada, após o que foi submetida à CC de sílica eluída com hexano/DCM para separar os triterpenos acetilados do material que não reagiu.

Os triterpenos acetilados foram então comparados por CG com os previamente isolados da W5.2.

A fração W5.9-10 foi submetida à CC aberta de sílica, eluída com gradiente de hexano/AcOEt. Apesar desse sistema de solventes ter funcionado bem em CCDC, o mesmo não ocorreu em coluna cromatográfica. Assim, as frações foram todas reunidas e submetidas à partição hexano/(MeOH/H₂O 95:5) 1:1. A fase hidroalcoólica da W5.9-10 foi submetida à CC aberta de Sephadex LH-20 e desta forma foi possível obter uma fração que continha apenas lactonas sesquiterpênicas (W17.9-13). Primeiro tentamos uma separação por CLAE. O melhor sistema encontrado usando uma coluna C-18 foi MeOH/H₂O 1:1. Iniciamos a separação na coluna semi-preparativa, nas mesmas condições de análise, porém não houve reprodução do cromatograma obtido na coluna analítica. As colunas utilizadas foram as mesmas que haviam sido usadas para a separação dos triterpenos e estavam em perfeito estado. Uma explicação possível para o ocorrido é que estivesse ocorrendo isomerização das lactonas sesquiterpênicas em presença de MeOH, usado como eluente e como dissolvente. Portanto, foi abandonado o uso de CLAE e a purificação das lactonas sesquiterpênicas só foi conseguida através de CCDP com seguidas eluições das placas cromatográficas que continham as frações W17.9-13 e W20.8.

Fluxograma 2.2: Estudo químico realizado com o extrato diclorometânico dos galhos de *W. crulsiana*.

2.6.4 ANÁLISE DO EXTRATO METANÓLICO DOS GALHOS

O extrato metanólico dos galhos de *W. crulsiana* foi submetido aos processos de separação sumariados no fluxograma 2.3.

Fluxograma 2.3: Estudo químico realizado com o extrato metanólico dos galhos de *W. crulsiana*.

Os constituintes das frações W19.17 e W19.24 são substâncias glicosiladas possivelmente flavonóides, conclusão obtida através de análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C . O breve estudo desse extrato visou detectar a presença de saponinas, que não foram encontradas nas diversas frações analisadas. Na fase aquosa, observamos através de RMN de ^1H e de ^{13}C a presença de carboidratos. O espectro de RMN de ^1H da fase diclorometânica mostrou um sinal *s/* muito intenso em δ 1,25, referente à presença de graxa, outros sinais entre δ 4,5 e 5,5 estavam em pequena concentração e não justificaram o seu fracionamento.

2.7 EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS DE *MIKANIA* SP. NOV.

2.7.1 COLETA E EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Realizaram-se duas coletas de material vegetal. A primeira feita em 28 de junho de 1997 por Guedes, M. L. e Guaré, F. - nº do coletor 5148 - excicata depositada no Herbário Alexandre Leal Costa UFBa. A coleta foi realizada no Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia. Esse material foi preparado para análise como descrito na seção 2.2.2.

A segunda coleta de *Mikania* sp. nov. foi realizada em 19 de setembro de 1998 por Núñez, C.V e Cruz, F.G. - nº de coletor 003 - no Morro do Pai Inácio, localizado na Chapada Diamantina, estado da Bahia (S 12° 27' 341" e W 41° 28' 502"). Excicata do material está depositada no herbário SPF do Instituto de Botânica da USP. Esse material foi submetido a arraste por vapor d'água, para extração do óleo volátil.

2.7.2 ANÁLISE DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO DAS FOLHAS

O extrato diclorometânico das folhas de *Mikania* sp. nov. apresentou em CCDC rastros, perfil cromatográfico da presença de ácidos. Optamos por tentar separá-los antes de metilá-los com diazometano porque o gênero *Mikania* se divide em espécies que produzem preferencialmente lactonas sesquiterpênicas e espécies que produzem preferencialmente diterpenos, sobretudo ácidos. Com base nestas informações, uma parte do extrato foi extraída com solução aquosa de NaOH 4%. Nessa concentração não houve separação completa dos ácidos. A outra parte foi extraída com solução aquosa de NaOH 10% resultando na separação dos ácidos diterpênicos. Este processo está mostrado no fluxograma 2.4.

Fluxograma 2.4: Estudo químico realizado com o extrato diclorometânico das folhas de *Mikania* sp. nov.

OBS: As siglas utilizadas (exemplo M1.4-16) significam:

M = pertencente à planta *Mikania* sp. nov.

M1. = primeira coluna realizada com extrato de *Mikania* sp. nov.

M1.4-16 = frações 4 a 16 reunidas da primeira coluna realizada com extrato de *Mikania* sp. nov.

2.7.3 ANÁLISE DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO DOS GALHOS

O estudo do extrato diclorometânico dos galhos foi realizado simultaneamente ao do extrato diclorometânico das folhas. Por esta razão, a mesma metodologia foi utilizada para ambos (fluxograma 2.5). Porém, logo no início encontramos a presença de aldeídos nesse extrato. Os aldeídos, presentes nessa espécie de *Mikania* e em outra que havia sido estudada anteriormente (seção 3.1), são difíceis de trabalhar, pois não são extraídos com NaHSO₃ 5% aq.⁴ e também não são protegidos com MeOH em HCl⁵ (possivelmente devido à posição impedida na qual o grupo se encontra) e na forma carbonílica, decompõem-se.

Como as substâncias 20 e 21 haviam sido isoladas também do extrato diclorometânico das folhas, decidimos encerrar o estudo do extrato diclorometânico dos galhos e nos concentrarmos no estudo das folhas, que não haviam indicado presença de aldeídos.

Fluxograma 2.5: Estudo químico realizado com o extrato diclorometânico dos galhos de *Mikania* sp. nov.

2.7.4 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS

600 g de folhas e 458 g de galhos de *Mikania* sp. nov. coletados em 19/09/1998 foram submetidos à extração por arraste a vapor d'água. Obtivemos 4,6 g de óleo volátil das folhas e 1,6 g de óleo volátil dos galhos (0,75 e 0,35 % de rendimento, respectivamente), rendimento muito alto.

2.7.5 ANÁLISE DOS ÓLEOS VOLÁTEIS

As análises dos óleos voláteis dos galhos e folhas de *Mikania* sp. nov. foram feitas por CG/EM e co-injeção de padrões de óleos voláteis. As substâncias identificadas estão mostradas na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Substâncias identificadas nos óleos voláteis de *Mikania* sp. nov.

Número da Substância	TR (min)	Folhas (%)	Galhos (%)	Substância Identificada
28	5,9	0,09	0,07	α -tujeno
29	6,1	23,6	24,8	α -pineno
30	6,4	0,2	0,1	canfeno
31	6,6	0,02	0,01	sabineno
32	7,4	61,9	48,3	β -pineno
33	7,9	2,7	2,3	α -felandreno
34	8,1	0,2	0,1	β -cimeno
-	8,3	0,1	0,05	NI
-	8,5	0,1	0,4	NI
35	8,7	2,4	2,3	limoneno
36	9,3	0,3	0,2	α -terpineno
37	10,5	0,1	0,1	<i>cis</i> sabinenol
38	13,1	0,3	0,3	4-terpineol
39	13,6	0,4	0,2	α -terpineol
40	18,1	0,1	0,5	α -cubibeno
41	18,8	0,5	3,2	α -copaeno
-	19,2	0,2	0,7	NI
-	19,9	0,1	0,5	NI
42	21,6	1,7	6,5	β -cedreno
43	22,0	0,7	1,2	δ -cadineno
44	22,7	0,2	0,5	<i>cis</i> nerolidol
45	24,0	0,4	0,2	epoxicariofileno
46	25,6	0,3	0,2	<i>epi</i> - α -cadinol
47	25,9	0,3	0,2	α -cadinol
-	33,5	0,1	0,5	NI
-	37,4	0,2	0,7	NI
-	38,2	0,08	0,1	NI

NI: substância não identificada.

IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

2.8 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS OU IDENTIFICADAS EM MISTURA DE *WUNDERLICHIA CRULSIANA*

TRITERPENOS

palmitato de β -amirina

palmitato de germanicoila

acetato de pseudotaraxasterila

acetato de lupella

20,24-damaradien-3-ona

lupe-3-ona

β -amirin-3-ona

germanic-3-ona

pseudotaraxaster-3-ona

taraxaster-3-ona

acetato de β-amirina

acetato de taraxasterila

acetato de isomotila

isomotiona

acetato de α-amirina

LACTONAS SESQUITERPÊNICAS

tubiferina

cadabicolona

4β(15),11α(13)-tetrahydro-
3-desidroaluzanina C

SESQUITERPENOS

2,6,10-bisabolatrieno

2.9 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS OU IDENTIFICADAS EM MISTURA DE *WUNDERLICHIA CRULSIANA*

TRITERPENOS

A identificação dos triterpenos foi realizada com base nas informações obtidas dos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C , no TR na CG e perfil cromatográfico em CCDC. Os triterpenos esterificados com ácido palmítico apresentam um deslocamento (R_f) em relação ao solvente de 0,64 em CCDC quando eluídos com hexano/DCM 8:2; os esterificados com acetato R_f de 0,48, nas mesmas condições e os triterpenos apresentam coloração alaranjada quando revelados com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. Os triterpenos hidroxilados na posição 3 apresentam R_f de 0,56 quando eluídos com DCM puro.

O fato da planta produzir uma grande quantidade de triterpenos (> 40% do extrato diclorometânico dos galhos) levou-nos a tentar a separação dessas substâncias. Após diversas tentativas pelas técnicas cromatográficas (CC e CLAE), chegamos a um bom resultado, com diversas frações com grau de pureza de 90 a 100% e outras em mistura de poucos constituintes. Mesmo nessas misturas conseguimos identificar os constituintes principais. Em dois casos, nos quais não pudemos identificar os constituintes minoritários das misturas, as frações foram novamente submetidas à CLAE (seção 2.6.3).

A identificação dos triterpenos, quando não puros, seguiu a metodologia de identificação de triterpenos em mistura⁵, que permitiu a separação dos sinais dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{13}C (BBD) de cada substância. Para a identificá-las, nos baseamos inicialmente nos deslocamentos químicos dos sinais relativos às ligações duplas e depois atribuímos os demais sinais.

A substância 1 encontrava-se em mistura com a 2 em duas frações com proporções diferentes. Nas figuras 2.1 a 2.4 estão mostrados os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , das duas frações. Através das análises destes espectros, separamos os sinais de RMN de ^{13}C de cada substância e iniciamos a identificação, conforme descrito a seguir.

Num rápido levantamento dos triterpenos relatados na literatura não encontramos dados de RMN de ^{13}C para todos os triterpenos que havíamos isolado, principalmente quando estes estavam esterificados ou oxidados na posição 3. O raciocínio utilizado para a identificação e atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C desses triterpenos foi idêntico ao utilizado para o palmitato de β -amirina 1, 3 β -amirinona 7 e acetato de β -amirina 11, a partir da comparação dos dados de RMN de ^{13}C da β -amirina, do ácido 3-oxo-oleanólico e do acetato de β -amirina-29-oxo-29-metoxi, obtidos da referência 6. Na tabela 2.2 estão mostrados os deslocamentos químicos encontrados para os sinais de RMN de ^{13}C para a β -amirina, o ácido 3-oxo-oleanólico e o acetato de β -amirina-29-oxo-29-metoxi. Para a primeira análise que faremos a seguir devem ser ignorados os sinais para os C-15 e C-22 para o ácido 3-oxo-oleanólico, porque sofrem deslocamento devido ao grupo ácido carboxílico na posição 28. Comparando os sinais para as duas primeiras substâncias observamos que a oxidação do carbono 3 (de hidroxila para carbonila) provoca os deslocamentos mostrados na tabela 2.3. Para a segunda análise, devemos observar apenas os sinais para os carbonos 1 a 4 e 23 a 25 da β -amirina e o acetato de β -amirina-29-oxo-29-metoxi. Os efeitos α , β e γ observados nos espectros de RMN de ^{13}C provocados pela acetilação da hidroxila do carbono 3 estão mostrados na tabela 2.4. Ajustando os efeitos α , β e γ podemos atribuir os sinais para as substâncias 1, 7 e 11 e a partir delas, para todos os outros triterpenos para os quais possam faltar dados de RMN de ^{13}C na literatura. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de 7 (em mistura com 8, 9 e 10) e

11 (em mistura com 12) estão mostrados nas figuras 2.5, 2.6, 2.7 e 2.8, respectivamente.

β -amirina

ácido 3-oxo-oleanólico

β -amirina-29-oxo-29-metoxi

β -amirin-3-ona

palmitato de β -amirina

acetato de β -amirina

Tabela 2.2: Dados de RMN de ^{13}C para β -amirina, ácido 3-oxo-oleanólico e acetato de β -amirina-29-oxo-29-metoxi, obtidos da referência 6.

^{13}C			
Posição	β -amirina	ácido 3-oxo-oleanólico	acetato de β -amirina-29-oxo-29-metoxi
1	38,7	39,1	38,4
2	27,3	34,1	23,6
3	79,0	217,6	81,1
4	38,8	47,4	37,8
5	55,3	55,3	55,4
6	18,5	19,6	18,3
7	32,8	32,2	32,7
8	38,8	39,3	39,9
9	47,7	46,0	47,6
10	37,6	36,7	37,0
11	23,6	23,0	23,6
12	121,8	122,1	123,0
13	145,1	143,8	144,4
14	41,8	41,8	41,7
15	26,2	27,7	26,6
16	27,0	23,5	27,0
17	32,5	46,7	32,5
18	47,4	41,4	46,1
19	46,9	45,8	40,6
20	31,1	30,6	42,8
21	34,8	33,8	29,1
22	37,2	32,3	36,0
23	28,2	26,4	28,3
24	15,5	21,4	16,8
25	15,6	14,9	15,6
26	16,9	16,7	16,8
27	26,0	25,8	26,0
28	28,4	-	28,2
29	33,3	33,0	179,6
30	23,7	23,6	19,4

Tabela 2.3: Efeitos α , β e γ provocados nos deslocamentos químicos dos carbonos 1, 2, 3, 4, 23, 24 e 25 pela oxidação do carbono 3.

Posição	β -amirina ⁶	efeitos α , β e γ			3 β -amirinona-28-COOH ⁶
1	38,7	+	0,4	=	39,1
2	27,3	+	6,8	=	34,1
3	79,0	+	138,6	=	217,6
4	38,8	+	8,6	=	47,4
		-	1,8	=	
23	28,2				26,4
24	15,5	+	5,9	=	21,4
25	15,6	-	0,7	=	14,9

Tabela 2.4: Efeitos α , β e γ provocados nos deslocamentos químicos dos carbonos 1, 2, 3, 4, 23, 24 e 25 pela acetilação da hidroxila do carbono 3.

Posição	β -amirina ⁶	efeitos α , β e γ			acetato de β -amirina-29-COOMe
1	38,7	-	0,3	=	38,4
2	27,3	-	3,7	=	23,6
3	79,0	+	2,1	=	81,1
4	38,8	-	1	=	37,8
23	28,2				28,3
24	15,5	+	1,3	=	16,8
25	15,6				15,6

A identificação da lupe-3-ona 6 foi realizada através de comparação dos dados de RMN de ^{13}C dos carbonos 1 a 16 da lupe-3-ona-30-hidroxi⁶ (tabela 2.5). Os demais carbonos foram atribuídos por comparação com o lupeol⁶. Os deslocamentos dos sinais de RMN de ^{13}C do acetato de lupeila 4 foram atribuídos utilizando os valores encontrados na tabela 6 para os efeitos α e β de acetilação da hidroxila no carbono 3. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de 4

(em mistura com 14) e 6 estão mostrados nas figuras 2.9, 2.10, 2.11 e 2.12, respectivamente.

Tabela 2.5: Dados de RMN de ^{13}C para o lupeol lupe-3-ona-30-hidroxi⁶ e os dados obtidos da análise dos efeitos α , β e γ provocados nos deslocamentos químicos dos carbonos 1, 2, 3, 4, 23 e 24 pela acetilação ou oxidação da hidroxila do carbono 3.

^{13}C								
Posição	lupeol ⁶	efeitos α , β e γ (de lupeol para acetato de lupefla)			Calculado	acetato de lupefla 4 (obs.)*	lupe-3-ona-30-hidroxi ⁶	lupe-3-ona 6 (obs.)*
1	38,7	-	0,3	=	38,4	38,39	39,6	39,56
2	27,4	-	3,7	=	23,7	23,69	34,1	34,07
3	78,9	+	2,1	=	81,0	80,94	218,3	217,90
4	38,8	-	1	=	37,7	37,78	47,3	47,24
5	55,3					55,38	54,9	54,88
6	18,3					18,20	19,7	19,63
7	34,2					34,22	33,6	33,53
8	40,8					40,84	40,8	40,73
9	50,4					50,33	49,7	49,75
10	37,1					37,08	36,9	36,83
11	20,9					20,95	21,6	21,43
12	25,1					25,09	26,7	25,12
13	38,0					38,04	38,1	38,14
14	42,8					42,82	42,9	42,84
15	27,4					27,43	27,4	27,39
16	35,5					35,43	35,4	35,48
17	43,0					42,98	43,0	42,93
18	48,2					48,28	48,8	48,21
19	47,9					47,99	43,8	47,89
20	150,9					150,87	154,7	150,70
21	29,8					29,83	31,8	29,79
22	40,0					39,99	39,8	39,93
23	28,0					27,94	26,7	26,61
24	15,4	+	1,3	=	16,7	16,51	21,0	20,98
25	16,1					16,17	16,0	15,90
26	15,9					15,98	15,8	15,74
27	14,5					14,50	14,5	14,43
28	18,0					18,00	17,7	17,97
29	109,3					109,37	106,8	109,36
30	19,3					19,29	65,0	19,27

* Dados observados dos espectros de RMN de ^{13}C , em CDCl_3 (125 MHz).

A identificação das substâncias 2 e 8 foi feita através de comparação dos dados de RMN de ^{13}C do germanicol. Para atribuir os valores dos carbonos 1 a 4, 23 e 24 foi utilizada a redução ou acréscimo dos efeitos α , β e γ provocados pela esterificação com ácido palmítico da hidroxila em C-3 (efeito similar ao provocado pela acetilação, para 2) e de oxidação da hidroxila para 8. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de 2 (em mistura com 1) e 8 estão mostrados nas figuras 2.1, 2.2, 2.5, e 2.6, respectivamente e os dados de RMN de ^{13}C , nas tabelas 2.7 e 2.8.

A substância 3 foi identificada seguindo o procedimento descrito para 4 por comparação com os dados de RMN de ^{13}C (tabela 2.6) para o pseudotaraxasterol⁶. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de 3 (em mistura com 15) estão mostrados nas figuras 2.13 e 2.14, respectivamente.

Os sinais obtidos do espectro de RMN de ^{13}C de 5 foram atribuídos por comparação direta dos valores para os carbonos 6 a 18, 25 a 28 do acetato de isoaglaiila e com os carbonos 19 a 22, 29 e 30 do acetato de isotirucalila (tabela 2.6). Para atribuir os valores dos carbonos 1 a 5, 23 e 24 foram diminuídos ou somados os efeitos α , β e γ aos valores dos deslocamentos apresentados pelo acetato de isoaglaiila. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de 5 estão mostrados nas figuras 2.15 e 2.16, respectivamente.

acetato de isoaglaiila

acetato de isotirucalila

5

20,24-damaradien-3-ona

As substâncias 9, 10, 12, 13, 14 e 15 foram identificadas por comparação com os respectivos triterpenos hidroxilados, da referência 6. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C estão mostrados nas figuras 2.17, 2.18, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.19, 2.20, 2.21, 2.22, 2.23 e 2.24, respectivamente. Os dados de RMN de ^{13}C observados nos espectros para todos os triterpenos estão relacionados nas tabelas 2.7 e 2.8.

Os quinze triterpenos identificados da espécie *Wunderlichia crulsiana* foram analisados por CG, nas mesmas condições. Os dados da tabela 2.9 vão contribuir para o estudo de triterpenos em mistura, como foi feito para identificar os triterpenos das frações W25.1-2 e W5.1ac.

Como podemos observar na tabela 2.9 apenas dois triterpenos presentes em baixas concentrações não puderam ser identificados.

Tabela 2.6: Dados de RMN de ^{13}C para acetato de isoaglaiila, acetato de isotirucalila e 5 e os dados obtidos da análise dos efeitos α , β e γ provocados nos deslocamentos químicos dos carbonos 1, 2, 3, 4, 23 e 24 pela oxidação da hidroxila do carbono 3.

Posição	^{13}C						5 (obs.)*
	acetato de isoaglaiila	acetato de isotirucalila	efeitos α , β e γ			calculado	
1	38,8	38,7	+	1,2	=	39,9	39,95
2	23,7	23,7	+	10,4	=	34,1	34,09
3	80,9	81,0	+	137,4	=	218,3	218,18
4	37,9	37,9	+	9,5	=	47,4	47,41
5	56,0	56,0	-	0,5	=	55,5	55,34
6	18,2	18,2					19,66
7	35,3	35,5					34,73
8	40,5	41,3					40,35
9	50,8	51,6					50,28
10	37,1	37,3					36,91
11	21,4	22,0					21,89
12	24,9	23,0					24,96
13	45,4	139,1					45,36
14	49,5	56,4					49,38
15	31,3	30,8					31,33
16	29,0	29,1					28,85
17	47,6	134,6					47,74
18	15,9	23,1					15,33
19	16,3	16,5					16,06
20	151,9	31,6					152,57
21	107,9	20,1					107,56
22	31,0	35,7					34,11
23	27,8	26,4					27,04
24	64,2	125,0					124,41
25	58,4	131,0					131,47
26	25,0	25,7					25,71
27	18,8	17,6					17,71
28	28,0	28,1	-	1,2	=	26,8	26,73
29	16,5	16,6	+	4,5	=	21,0	21,01
30	15,7	16,7					15,81

* Dados observados dos espectros de RMN de ^{13}C , em CDCl_3 (125 MHz).

Tabela 2.7: Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, em CDCl_3 (125 MHz).

	^{13}C						
Posição	1	2	3	4	5	6	7
1	38,20	38,38	38,44	38,39	39,95	39,56	39,24
2	23,57	23,69	23,69	23,69	34,09	34,07	34,10
3	80,55	80,49	80,94	80,94	218,18	217,90	217,47
4	37,71	37,81	37,78	37,78	47,41	47,24	47,36
5	55,20	55,33	55,38	55,38	55,34	54,88	55,27
6	18,23	18,15	18,19	18,20	19,66	19,63	19,61
7	32,54	34,69	34,17	34,22	34,73	33,53	32,13
8	39,76	40,79	41,08	40,84	40,35	40,73	39,24
9	47,51	51,07	50,33	50,33	50,28	49,75	46,82
10	36,80	37,78	37,01	37,08	36,91	36,83	36,62
11	23,57	21,60	21,62	20,95	21,89	21,43	23,59
12	121,61	26,14	27,60	25,09	24,96	25,12	121,47
13	145,17	39,16	39,21	38,04	45,36	38,14	145,17
14	41,66	43,27	42,33	42,82	49,38	42,84	41,80
15	26,10	27,48	27,03	27,43	31,33	27,39	26,08
16	26,88	37,33	36,70	35,43	28,85	35,48	26,90
17	32,45	34,32	34,37	42,98	47,74	42,93	32,45
18	47,18	142,61	48,69	48,28	15,81	48,21	47,27
19	46,74	129,72	36,31	47,99	16,06	47,89	46,74
20	31,05	32,31	139,79	150,87	152,57	150,70	31,01
21	34,83	34,14	118,89	29,83	107,56	29,79	34,68
22	37,10	37,33	42,17	39,99	34,11	39,93	37,07
23	28,01	27,90	27,94	27,94	27,04	26,61	26,44
24	16,75	16,75	16,51	16,51	124,41	20,98	21,44
25	15,52	16,32	16,50	16,17	131,47	15,90	15,15
26	16,76	16,57	16,05	15,98	25,71	15,74	16,68
27	25,92	14,53	14,70	14,50	17,71	14,43	25,82
28	28,37	25,22	17,71	18,00	26,73	17,97	28,36
29	33,30	31,32	22,53	109,37	21,01	109,36	33,27
30	23,65	28,37	21,62	19,29	15,33	19,27	23,64
31	ác. gr.	ác. gr.	170,90	170,93	-	-	-
32	ác. gr.	ác. gr.	21,29	21,30	-	-	-

Tabela 2.8: Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15, em CDCl_3 (125 MHz).

	^{13}C							
Posi- ção	8	9	10	11	12	13	14	15
1	38,38	39,63	38,83	38,20	38,82	35,14	36,22	38,58
2	23,69	34,09	27,43	23,57	27,42	24,32	36,35	23,66
3	80,49	218,03	217,97	80,55	217,98	81,00	218,01	81,02
4	37,81	47,26	38,20	37,71	38,21	37,82	45,20	37,77
5	55,33	54,85	54,87	55,20	54,86	50,55	51,57	55,37
6	18,15	19,67	18,19	18,23	18,18	20,38	20,91	18,31
7	34,69	33,51	33,98	32,54	33,97	27,08	27,39	32,97
8	40,79	40,99	40,79	39,76	40,77	134,27	27,39	40,14
9	51,07	49,76	50,13	47,51	50,12	134,15	135,86	47,75
10	37,78	36,79	36,78	36,80	36,77	37,45	133,50	36,89
11	21,60	22,15	21,03	23,57	21,01	19,00	37,96	23,26
12	26,14	27,62	26,15	121,61	26,16	30,25	20,84	124,40
13	39,16	39,33	39,29	145,17	39,30	41,06	30,78	139,70
14	43,27	42,39	42,04	41,66	42,03	36,72	41,68	42,18
15	27,48	27,01	26,66	26,10	26,65	26,98	37,23	28,76
16	37,33	36,63	38,20	26,88	38,22	35,95	27,47	26,69
17	34,32	34,37	34,47	32,45	34,45	42,89	34,98	33,79
18	142,61	48,69	48,67	47,18	48,66	52,75	43,46	59,20
19	129,72	36,28	39,30	46,74	39,32	18,91	53,18	39,72
20	32,31	139,74	154,33	31,05	154,31	28,35	19,37	39,68
21	34,14	118,89	25,56	34,83	25,54	59,81	28,75	31,30
22	37,33	42,15	38,83	37,10	38,82	30,74	60,24	41,60
23	27,90	26,73	28,07	28,01	28,06	28,00	31,14	28,18
24	16,75	20,99	15,68	16,75	15,61	16,60	27,46	16,74
25	16,32	16,12	16,49	15,52	16,47	22,07	20,31	15,74
26	16,57	15,90	16,04	16,76	16,02	22,08	22,48	16,93
27	14,53	14,65	14,64	25,92	14,63	15,73	16,92	23,40
28	25,22	17,70	19,46	28,37	19,45	14,60	14,99	28,12
29	31,32	22,50	24,88	33,30	24,87	22,96	23,34	17,49
30	28,37	21,57	107,21	23,65	107,22	21,31	22,16	21,36
31				170,86	170,56	172,02	-	170,91
32		-	-	21,23	21,02	20,27	-	21,24

Tabela 2.9: TRs em CG dos triterpenos identificados do extrato diclorometânico dos galhos de *Wunderlichia crulsiana*. Condição usada: 289 °C (0 min), 10 °C/min até 290 °C (30 min), temperatura do injetor: 280 °C, temperatura do detector: 310 °C.

Fração	massa (mg)	TR (min)	%	Substância Identificada
W16.9	8	9,789	100	20,24-damaradien-3-ona 5
W16.10	76	11,094	100	3-lupeona 6
W16.10a	154	10,401	3	não identificado
		11,080	97	3-lupeona 6
W16.11	114	10,278	49	3 β -amirinona 7
		10,395	24	3-germaniconona 8
		12,780	18	3-pseudotaraxasterona 9
		13,030	8	3-taraxasterona 10
W16.12	43	11,054	6	3-lupeona 6
		12,051	3	não identificado
		12,770	91	3-pseudotaraxasterona 9
W16.15	125	11,939	7	3-isomotiona 14
		13,370	93	acetato de lupeíla 4
W16.16	92	12,414	72	acetato de β -amirina 11
		15,798	22	acetato de taraxasteríla 12
W16.17	74	13,340	9	acetato de α -amirina 15
		15,506	91	acetato de pseudotaraxasteríla 3
W16.19	16	14,460	100	acetato de isomotila 13
W23.1	100	11,921	3	3-isomotiona 14
		13,375	97	acetato de lupeíla 4
W23.2	5	11,998	55	3-isomotiona 14
		13,423	45	acetato de lupeíla 4
W23.3	50	12,388	6	acetato de β -amirina 11
		15,489	94	acetato de pseudotaraxasteríla 3
W23.4	5	13,330	100	acetato de α -amirina 15
W25.1-2	1300	7,520	7	não identificado
		12,582	20	acetato de β -amirina 11
		12,716	11	3-pseudotaraxasterona 9
		13,666	42	acetato de lupeíla 4
		14,593	4	acetato de isomotila 13
		15,654	9	acetato de pseudotaraxasteríla 3
		15,890	2	acetato de taraxasteríla 12
		12,415	40	acetato de β -amirina 11
W5.1 ac	1000	13,598	25	acetato de lupeíla 4
		15,524	10	acetato de pseudotaraxasteríla 3

LACTONAS SESQUITERPÊNICAS

O espectro de RMN de ^1H da fração W5.9-10 (figura 2.25) mostrou a presença de vários sinais entre δ 6,8 e δ 4,2, indicando a presença de ligações duplas e hidrogênios ligados a carbonos oxigenados. A feição do espectro de RMN de ^1H da fração associada à presença de lactonas sesquiterpênicas na espécie *Wunderlichia mirabilis* (vide Capítulo 1) sugerem que a mesma seja constituída por substâncias desta classe. Durante o processo de fracionamento (vide seção 2.6.3) obtivemos a fração W17.9-13, cujo espectro de RMN de ^1H (figura 2.26) mostrou os mesmos sinais da W5.9-10, com a exceção do sinal em δ 1,25 de cadeia metilênica de ácidos graxos. O cromatograma obtido no cromatógrafo gás da fração W17.9-13 mostrou a presença de 3 substâncias em maior concentração. Separação da fração W17.9-13 (seção 2.6.3) originou as misturas W20.7, W21.6 e W21.7. Na tabela 2.10 estão os TRs dos constituintes destas frações. A identificação das substâncias presentes está descrita a seguir.

Tabela 2.10: TRs das frações W17.9-13, W21.7, W21.6 e W20.7. Condição de análise: 200 °C (0 min), 10 °C/min até 220 °C (10 min), 10 °C/min até 280 °C (10 min). Temperatura do injetor: 250 °C, temperatura do detector: 310 °C.

Frações	TR (min)	%	Substância identificada
W17.9-13	6,118	16	
	6,735	35	
	7,173	15	
W21.7	6,114	90	4 β (15),11 α (13)-tetraidro-3-desidrozaluzanina C 18
	6,680	10	cadabicilona 17
W21.6	6,120	40	4 β (15),11 α (13)-tetraidro-3-desidrozaluzanina C 18
	6,737	60	cadabicilona 17
W20.7	7,178	90	tubiferina 16

A temperatura de eluição das substâncias em 220 °C sugere a presença de substâncias com menor número de átomos de C do que os diterpenos, pois estes últimos eluem na temperatura aproximada de 230 °C e superior aos sesquiterpenos com uma oxigenação que eluem na temperatura de ~ 160 °C.

A análise dos espectros de RMN de ^1H da fração W20.7 (figuras 2.27, 2.28 e 2.29) indicou a presença dos seguintes grupos:

- um *d* em δ 6,71 (1H, $J = 9,9$ Hz) e um *d* em δ 5,91 (1H, $J = 9,9$ Hz) referentes a dois CH em ligação dupla *cis*; em princípio não deve haver hidrogênios nos carbonos vizinhos a essa ligação dupla;
- um *d* em δ 6,10 (1H, $J = 3,2$ Hz) e um *d* em δ 5,43 (1H, $J = 3,1$ Hz) referentes a dois hidrogênios em ligação dupla terminal, acoplando um com o outro e sem hidrogênio no carbono vizinho;
- um *t* em δ 3,97 (1H, $J = 10,8$ Hz) referente a um hidrogênio oximetínico axial vizinho a dois hidrogênios axiais;
- um *d* em δ 1,40 (3H, $J = 6,8$ Hz), referente a um grupo metílico desprotegido ligado a CH;
- um *s* em δ 1,17 (3H), referente a um grupo metílico em carbono quaternário.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração W20.7 (figura 2.30) apresentou 15 sinais. Entre estes sinais podemos destacar presença de carbonila em δ 200,32; presença de C sp^2 carboxílico quaternário em δ 170,00 e δ 138,41; CH sp^2 em δ 157,76 e δ 126,78; CH₂ sp^2 em δ 117,32. Com esses sinais podemos pensar em anel lactônico tipo α,β -insaturado e carbonila conjugada à ligação dupla. O anel lactônico (e não apenas um éster) é confirmado pela existência de CH em δ 81,99. A fórmula molecular para 16, sugerida pelos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , é $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$, cujo índice de deficiência de hidrogênio (IDH) é 7. Estes dados estão compatíveis com a estrutura de uma lactona sesquiterpênica contendo 2 ligações duplas, 2 carbonilas, 1 anel lactônico e 2 anéis carbônico. Com essas informações propusemos a estrutura 16 para o principal constituinte da fração W20.7. A

caracterização da ligação dupla entre os carbonos 1 e 2 e a carbonila em 3, ao invés de estar entre os C 2 e 3 e a carbonila em 1 foi feita com base no espectro de RMN de ^1H (500 MHz) pois observamos dois *d* ($J = 9,9$ Hz) bem definidos em δ 5,9 e δ 6,7, como se espera para 16; na outra proposta (16a) esperaríamos um *dd* para o H-3.

A substância 16 já havia sido descrita¹¹, porém apenas os dados de RMN de ^1H foram relatados. Através de comparação dos dados de RMN de ^{13}C de estruturas próximas^{12,13} foi possível atribuir os deslocamentos químicos aos respectivos carbonos de 16. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C estão mostrados nas tabelas 2.11 e 2.12, respectivamente. Espectroscopia no IV não foi utilizada por deficiência no equipamento.

O principal constituinte da fração W21.7 foi identificado com base nos seguintes dados obtidos do espectro de RMN de ^1H (figura 2.31, 2.32, 2.33 e 2.34):

- um *s* em δ 4,98, 1H e um *s* em δ 4,67, 1H, referentes a dois hidrogênios em ligação dupla terminal sem acoplamento entre eles ou hidrogênio no carbono vizinho;
- um *t* em δ 3,95, 1H ($J = 9,2$ Hz), referente a um hidrogênio oximetínico axial vizinho a dois hidrogênios axiais;

- um *ddd* em δ 3,05, 1H ($J = 7,9$ e $3,7$ Hz), referente a um hidrogênio possivelmente vizinho a CH_2 apresentando relação axial e equatorial;
- um *d* em δ 1,26, 3H ($J = 7,0$ Hz), referente a um grupo metílico desprotegido vizinho a CH;
- um *d* em δ 1,23, 3H ($J = 7,1$ Hz), referente a um grupo metílico desprotegido vizinho a CH.

O procedimento foi idêntico ao anterior. O espectro de RMN de ^{13}C (figura 2.35) apresentou 15 sinais entre os quais podemos citar: 3 C sp^2 quaternários em δ 218,96; δ 178,07 e δ 149,22 e um CH_2 sp^2 em δ 112,59 e CH em δ 88,43 sugerindo um anel lactônico e uma ligação dupla terminal não conjugada com a carbonila.

4 β (15),11 α (13)-tetraidro-
3-desidrozaluzanina C

O anel lactônico foi posicionado entre 6 e 7 e não entre 7 e 8 com base no sinal observado no espectro de RMN de ^1H para o hidrogênio oximetínico, pois observamos um *t* em δ 3,9 ($J = 9,2$ Hz) e não um *ddd* ou *dt* como seria de esperar em 18a. O sinal em δ 3,05 (H1) define a posição da carbonila em 3, porque se estivesse em 2, como em 18b, observaríamos um *s*. A fórmula molecular para 18 é $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$, cujo IDH é 6; sendo 2 carbonilas, 1 ligação dupla, 1 anel lactônico e 2 anéis carbônicos, compatíveis com a estrutura proposta. Os dados de RMN de ^1H

e de ^{13}C (tabelas 2.11 e 2.12, respectivamente) de 18 foram confirmados na literatura^{13,14}.

A fração W21.6 contém dois constituintes principais, um majoritário e um minoritário. O minoritário foi identificado como sendo 18. Utilizando a metodologia de identificação de sesquiterpenos em mistura¹⁵ conseguimos obter alguns sinais do espectro de RMN de ^1H (figura 2.36, 2.37 e 2.38) para o constituinte majoritário.

- um *t* em δ 3,89 (1H, $J = 10,2$ Hz), referente a 2 acoplamentos do tipo axial-axial em anéis de 6 membros;
- um *ddd* em 2,42 (1H, $J = 15,6$; 5,7 e 2,5 Hz), referente a um hidrogênio acoplado com outros 3 hidrogênio em axial, equatorial e geminal.
- um *d* em δ 1,25 (3H, $J = 6,7$ Hz);
- um *d* em δ 1,21 (3H, $J = 6,9$ Hz);
- um *s* em δ 1,18 (3H);

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C (figura 2.40) foi possível obter quinze sinais (subtraídos os sinais da substância 18). Unindo as informações supra-citadas foi possível propor a estrutura 17, a qual foi confirmada por comparação com dados da literatura¹⁶. Os dados de ^{13}C estão mostrados na tabela 2.11.

17

cadabicolona

Tabela 2.11: Dados de RMN de ^1H das substâncias 16, 17 e 18, em CDCl_3 (500 MHz).

Posição	^1H		
	16	17	18
1	6,71 <i>d</i> (9,9)	3,05 <i>ddd</i> (7,9; 7,9 e 3,7)	
2	5,91 <i>d</i> (9,9)		2,42 <i>ddd</i> (15,6; 5,7 e 2,5)
4			
5			
6	3,97 <i>t</i> (10,8)	3,95 <i>t</i> (9,2)	3,89 <i>t</i> (10,2)
7			
8			
9			
11	-		
13	6,10 <i>d</i> (3,2)	1,26 <i>d</i> (7,0)	1,25 <i>d</i> (6,7)
	5,43 <i>d</i> (3,1)		
14	1,17 <i>s</i>	4,98 <i>s</i>	1,18 <i>s</i>
		4,67 <i>s</i>	
15	1,40 <i>d</i> (6,8)	1,23 <i>d</i> (7,1)	1,22 <i>d</i> (6,9)

Constante de acoplamento, *J*, dado entre parêntesis e em Hz.

Tabela 2.12: Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 16, 17 e 18, em CDCl_3 (75 MHz).

Posição	^{13}C		
	16	17	18
1	157,76	40,64	47,27
2	126,78	37,18	43,97
3	200,32	211,23	218,96
4	42,08	40,62	48,79
5	52,34	52,91	39,85
6	81,99	83,08	88,43
7	50,22	53,56	51,05
8	21,22	23,10	39,03
9	37,26	40,25	32,98
10	38,50	36,56	149,22
11	138,41	44,96	41,82
12	170,00	178,82	178,07
13	117,32	13,90	13,36
14	19,29	18,34	112,59
15	14,60	12,38	14,07

SESQUITERPENOS

A determinação estrutural do constituinte presente na fração W9.1 foi feita com base na análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e CG. No espectro de RMN de ^1H (figura 2.41) observamos os seguintes sinais: um *m* em 5,0 ppm, outro *m* em 2,0 ppm, um *s* em 1,59 ppm e outro *s* em 1,67 ppm. A fração foi submetida a CG na condição usada para óleo volátil e o tempo de retenção

indicou tratar-se de um sesquiterpeno não oxigenado. O espectro de RMN de ^{13}C (figura 2.42) mostrou 15 sinais, sendo 4 carbonos sp^2 quaternários em δ 124,39; δ 131,24; δ 134,88 e em δ 135,09 e 2 CH sp^2 em δ 124,25 e δ 125,29, sinais referentes à ligações duplas isoladas (tabela 2.13). Reunindo as informações propusemos o 2,6,10-bisabolatrieno como sendo o principal constituinte da fração W9.1. A estrutura foi confirmada através de comparação com dados de RMN de ^{13}C do 12-*E*- γ -bisabolol¹⁷.

19

2,6,10-bisabolatrieno

Tabela 2.13: Dados de RMN de ^{13}C da substância 19, em CDCl_3 (75 MHz).

Posição	^{13}C (ppm)*
1	28,26
2	124,25 ^c
3	134,88
4	39,71 ^a
5	26,64 ^b
6	131,24
7	124,39
8	39,73 ^a
9	26,75 ^b
10	124,29 ^c
11	135,09
12	25,68
13	17,66
14	16,02 ^d
15	15,98 ^d

* a, b, c, e d, estes valores podem ser trocados.

2.10 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *MIKANIA* SP. NOV.

DITERPENOS

20

labda-8(17),12,14-trieno-19-ato
de metila

21

pimara-9(11),15-dieno-19-ato
de metila

22 e 23

labda-12-epoxi-8(17),14-
dieno-19-ato de metila

24

labda-8(17),13(16),14-
trieno-19-ato de metila

25

ácido eritroxila-
3,15-dien-19-óico

ácido labda-8(17),13-dien-
12,15-epoxi-19-óico

labda-8(17),14-dieno-12,13-
diol-19-ato de metila

MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS DO ÓLEO ESSENCIAL

28
 α -tujeno

29
 α -pineno

30
canfeno

31
sabineno

32
 β -pineno

33
 α -felandreno

34
cimeno

35
limoneno

36
 α -terpineno

37
cis sabinenol

38

4-terpineol

39 α -terpineol **40** α -cubibene **41** α -copaene **42** β -cedrene **43** δ -cadinene **44***cis* nerolidol **45**

epoxi-cariofilene

46*epi*- α -cadinol **47** α -cadinol

2.11 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *MIKANIA* SP. NOV.

DITERPENOS

Os diterpenos isolados das folhas de *Mikania* sp. nov. foram identificados através da análise dos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e TRs em CG, mostrados na tabela 2.13.

Nos espectros de RMN de ^1H da fração M1.4-16 (figuras 2.43, 2.44, 2.45 e 2.46) é possível observar, entre outros sinais, um *dd* em δ 6,3 ($J = 17$ e 10Hz) e um *ddd* em δ 5,8 ($J = 17$, 10 e 2 Hz) referentes a uma ligação dupla terminal e um *s/* em δ 0,5 ppm. Os TRs no cromatograma a gás das substâncias presentes nessa fração sugerem a presença de diterpenos e os sinais de RMN de ^1H sugerem o esqueleto labdano. O espectro de RMN de ^{13}C (figura 2.47) mostra que existem 2 constituintes principais. Usando a mesma metodologia de separação dos sinais de deslocamento químico de ^{13}C em mistura⁶ aplicada para triterpenos, propusemos as estruturas 20 e 21, confirmadas na literatura^{18,19}. Os dados de RMN de ^{13}C estão mostrados na tabela 2.14.

A análise da fração M1.20-30 por CG revelou a presença de 2 constituintes principais, sendo que o TR, 13,491 min (40%) e 13,300 min (45%) indicavam 2 diterpenos. Os espectros de RMN de ^1H (figura 2.48, 2.49, 2.50 e 2.51) mostram um *dd* em δ 5,1 ($J = 17$ e 10 Hz), um *dd* em δ 5,3 ($J = 17$ e 2 Hz) e um *dd* em δ 5,1 ($J = 10$ e 2 Hz), sinais referentes a uma ligação dupla terminal. Dois grupos metílicos, sendo um protegido (*s* em δ 0,5) e um outro (*s* em δ 1,4) sugerindo CH_3 em carbono quaternário oxigenado. Os espectros de RMN de ^{13}C (BBD e DEPT 135 $^\circ$ figuras 2.52 e 2.53) revelam a presença de um CH em δ 64,6 e um C em δ 60,0 sugerindo a presença de epóxido nesses constituintes. Comparando os sinais de ^{13}C (tabela 2.15) de 22 e 23 com 20 observa-se um deslocamento no valor dos sinais para o C-9 devido a um efeito γ do epóxido. O efeito β , que seria esperado no valor de C-11 é pequeno e não observado, como frequentemente ocorre. A duplicação de sinais, visível no espectro de RMN de ^{13}C , poderia indicar a presença de dímeros, no entanto, os TRs evidenciam que eles são monômeros. Como a ligação dupla em Δ^{12} é a mais reativa frente a uma epoxidação, propomos que a mistura seja constituída dos dois estereoisômeros labdan- α 12-epoxi-8(17),14-dieno-19-ato de metila e labdan- β 12-epoxi-8(17),14-dieno-19-ato de metila. Este é um indício que essas substâncias não são naturais, mas são oxidadas durante o processo de extração e purificação. Os dados de RMN de ^{13}C foram confirmados com os da literatura²⁰.

22 e 23

labda-12-epoxi-8(17),14-
dieno-19-ato de metila

Os espectros de RMN de ^1H , com expansão e de ^{13}C da fração M8.2 estão mostrados nas figuras 2.54, 2.55 e 2.56. Apesar da fração conter uma mistura de substâncias foi possível identificar o principal constituinte como sendo o 24, usando a mesma metodologia que para os demais terpenos. A estrutura foi confirmada por comparação do TR (tabela 2.14) e RMN de ^{13}C (tabela 2.14) com a 20 e dados de RMN de ^{13}C da literatura²¹.

24

labda-8(17),13(16),14-
trieno-19-ato de metila

O principal constituinte da fração M8.6-8 foi identificado através dos espectros de RMN de ^1H , com expansões, e de ^{13}C (figuras 2.57, 2.58, 2.59 e 2.60, respectivamente). No espectro de RMN de ^1H observamos os seguintes sinais: um *dd* em δ 5,8 ($J = 17$ e 11 Hz), um *dd* em δ 4,9 ($J = 17$ e 1 Hz) e um *dd* em δ 4,8 ($J = 11$ e 1 Hz), sinais referentes à ligação dupla terminal. Este tipo de ligação dupla terminal sugere o esqueleto labdano apesar dos valores de deslocamento químico de RMN de ^1H estarem mais protegidos que no caso dos outros labdanos. O espectro de RMN de ^{13}C mostra a presença de 20 sinais (com pequena impureza) entre eles quatro sinais de C sp^2 de duas ligações duplas em δ 151,3 e 108,6 e δ 140,1 e 141,5 e outro C sp^2 de carboxila em δ 172,6 ppm. Este valor poderia ser de éster porém não se observam sinais referentes à metoxila no espectro de RMN de ^1H ou no de RMN de ^{13}C . Por esta razão, a carboxila deve estar conjugada com uma das ligações duplas, tratando-se assim de um ácido diterpênico. O valor de uma das ligações duplas (δ 151,3 e 108,6) está bem próximo daquele encontrado para a substância 21 cujo esqueleto é de

um pimarano (δ 150,1 e 109,1) indicando que essa parte da molécula é semelhante. A outra ligação dupla está conjugada com a carboxila, para que isto ocorra é necessária uma migração da metila 18 do carbono 4 para o 5. Isto implica em uma estereoquímica do C - 4 contrária a até agora encontrada para os diterpenos da *Mikania sp.*, na qual a carboxila está em posição equatorial (C - 19) e o grupo metílico, em axial. O precursor poderá ser tanto um labdano como um pimarano com ligação dupla em Δ^8 ou $\Delta^{9(11)}$ (esquema 2.1). Assim a estrutura proposta para 25 é de um ácido do tipo eritroxilano, descrito na literatura na forma de éster metílico²².

Esquema 2.1: Formação de 25 a partir de migrações de hidrogênio e grupos metílicos em um pimarano.

Os mesmos procedimentos foram feitos na identificação de 26 e 27. O TR no CG sugere que 26 seja um diterpeno. Uma análise dos espectros de RMN de ^1H da fração M8.8 (figuras 2.61, 2.62 e 2.63) mostra a presença de 3 grupos metílicos em carbono quaternário, em δ 0,57, em 1,24 e em 1,74. O grupo metílico em δ 0,57 provavelmente é o C - 20 de um labdano; esta proteção ocorre quando o grupo metílico está do mesmo lado da molécula que o grupo carboxílico. O grupo metílico em δ 1,74 deve estar em C sp^2 . Comparação dos dados de RMN de ^{13}C indicou igualdade com a parte cíclica de 21 e 22 (tabela 2.15) inclusive na existência da ligação dupla $\Delta^{8(17)}$. A existência de oxigênio na cadeia lateral,

compatível com o TR é deduzido pelos δ 85,9 CH e 73,8 CH₂, cujos espectros de RMN de ¹³C (BBD e DEPT 135°) estão mostrados nas figuras 2.64 e 2.65. Um efeito γ de 2,0 ppm, verificado no C - 9 e um efeito β no C - 11 de 5,5 ppm quando comparados os valores com os de 22, sugerem oxigenação em C - 12. A presença de um grupo metílico em carbono olefínico sugeriu inicialmente a estrutura de um ácido labdan-8(17),13-dien-12,15 diol-19-óico. Os valores de δ observados para os carbonos 12 e 15 não conferem com os encontrados na literatura²³ para substâncias análogas. Assim sendo, sugerimos para esta substância a estrutura do ácido labdan-8(17),13-dien-12,15-epoxi-19-óico. O espectro de massas não mostrou o pico molecular. Não encontramos relato desta substância na literatura.

26

ácido labda-8(17),13-dien-
12,15-epoxi-19-óico

27

labda-8(17),14-dieno-12,13-
diol-19-ato de metila

A substância 27 foi identificada pela comparação dos dados de RMN de ¹H e de ¹³C obtidos dos espectros (figuras 2.66, 2.67, 2.68, 2.69 e 2.70) com os descritos na literatura^{20,24}. Embora as referências anteriores refiram-se a 27, 22 e 23 como produtos naturais, a possibilidade dessas substâncias serem artefatos obtidos durante o fracionamento é grande. O produto natural 20 é epoxidado, reação que acontece frequentemente com sesquiterpenos. Um fato que corrobora com esta hipótese é a presença dos dois isômeros α e β epoxidados, com porcentagem muito semelhante. Os epóxidos podem reagir com (OH)⁻, durante a

extração básica, ou com H_2O , após a protonação, durante a acidificação; justificando a presença de 27.

Tabela 2.14: TRs para 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27 obtidos no CG.
Condição de análise: 160°C (0 min), $6^\circ\text{C}/\text{min}$ até 290°C (10 min).

Substância	TR (min)	T. eluição ($^\circ\text{C}$)	Fórmula	Obs
21	8,165	208	$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$	ácido metilado
24	12,185	232	$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$	ácido metilado
23	13,300	238	$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_3$	ácido metilado
22	13,491	238	$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_3$	ácido metilado
20	14,273	244	$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$	ácido metilado
25	15,152	250	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$	ácido
26	15,900	250	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$	ácido
27	16,012	256	$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4$	ácido metilado

Tabela 2.15: Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27, em CDCl_3 (125 MHz).

^{13}C								
Posição	20	21	22	23	24	25	26	27
1	39.2	41.7	39.0	39.0	39.2	16.8	38.8	39.0
2	19.9	18.9	19.8	19.8	19.9	27.6	19.9	19.9
3	38.4	38.2	38.4	38.4	38.4	140.1	38.7	38.7
4	44.2	44.2	44.2	44.2	44.2	141.5	44.3	44.3
5	56.2	51.0	56.1	56.1	56.2	37.9	56.2	56.2
6	25.9	20.3	26.0	26.3	25.9	32.0	26.1	26.2
7	38.1	29.0	38.1	38.1	38.8	25.7	38.0	38.2
8	147.9	28.3	148.3	148.3	147.9	42.4	148.3	148.5
9	56.3	149.8	53.7	53.7	56.3	36.4	51.8	51.6
10	40.0	38.2	39.9	39.9	40.0	54.1	40.1	39.9
11	23.2	116.5	23.2	23.2	23.2	36.5	28.6	26.3
12	133.8	36.4	64.6	64.6	29.6	35.1	85.9	75.8
13	133.3	34.8	60.0	60.0	133.3	36.8	139.2	76.0
14	141.5	41.9	140.9	140.9	151.2	39.0	119.9	140.8
15	109.8	150.1	115.5	115.5	109.8	151.3	73.8	114.5
16	12.2	109.1	15.3	15.4	108.5	108.6	12.5	24.5
17	107.5	22.1	106.8	106.8	107.5	23.2	106.3	106.6
18	28.7	28.3	28.8	28.6	28.7	172.6	29.1	28.8
19	177.7	177.6	177.5	177.6	177.7	21.3	183.6	177.8
20	12.5	23.0	12.6	12.4	12.5	12.3	13.0	12.7
21	51.1	51.3	51.1	51.1	51.0	-	-	51.2

MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS DO ÓLEO VOLÁTIL

Os dois principais monoterpenos presentes no óleo essencial das folhas e dos galhos de *Mikania* sp. nov. foram identificados como o α - e β - pineno por análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (figuras 2.71 e 2.72) seguindo a metodologia de análises de misturas¹⁵. Os outros constituintes foram identificados por CG/EM e co-injeção de padrões²⁵. A Dra. Anja Reltenburg-Looman, da Universidade de Lieden, injetou os óleos voláteis da *Mikania* sp. nov. e na seqüência diversos óleos voláteis de composição química conhecida. O cromatógrafo utilizado continha duas colunas capilares acopladas (DB-1 e Carbowax), dois detectores e dois registradores. Dessa forma obtivemos 2 cromatogramas de cada óleo injetado. A comparação foi feita por sobreposição dos TRs dos constituintes do óleo volátil de *Mikania* sp. nov. com os das outras. Para confirmar, foi utilizado o programa ITDS com bancos de dados de massas de substâncias. Os cromatogramas dos óleos voláteis das folhas e dos galhos estão mostrados nas figuras 2.73 e 2.74, respectivamente.

2.12 DISCUSSÃO

O estudo químico do espécimen de *Wunderlichia crulsiana* focalizou extratos de baixa e média polaridade. Neles identificamos quinze triterpenos, três lactonas sesquiterpênicas e um sesquiterpeno. Substâncias destas classes (exceto sesquiterpeno) foram também encontradas em *W. mirabilis* e porém as lactonas e os sesquiterpenos não haviam sido encontrados no estudo anterior com *W. crulsiana*. Embora não tenhamos analisado os extratos mais polares em detalhe, é possível prever neles a presença de flavonóides glicosilados. Não detectamos a presença de flavonóides livres e caso ocorram, devem estar em concentração muito pequena.

O estudo químico de *Mikania* sp. nov. restringiu-se ao isolamento e identificação de ácidos diterpênicos nos extratos diclorometânicos das flores e galhos e no estudo dos óleos voláteis desses dois órgãos. Não é possível descartar a presença de lactonas sesquiterpênicas na planta, porém é evidente a predominância de ácidos diterpênicos na mesma.

As duas espécies estudadas pertencem a tribos diferentes. As substâncias encontradas nas duas plantas estão de acordo com os dados relatados na literatura para as tribos às quais elas pertencem.

2.12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vogel, A. I. (1978) Química Orgânica, Vol. 1, Ao Livro Técnico S.A., 47-49.
2. Varcарcel Casas, M. y Silva Rodriguez, M. (1984) Teoria y Práctica de la Extracción Líquido-Líquido, Editorial Alhambra, 1-10.
3. "Step Gradient Elution in Gel Permeation Chromatography. A New Approach to Natural Products Separations" Cardelina, J.H. (1983) *Journal of Natural Products* 46, 2, 196-199.
4. Gutsche, C.D. (1969) Química de Compostos Carbonílicos, Ed Edgard Blücher Ltda., 51-52.
5. "Studies in the Synthesis of Cortisone. Part III*. The Degradation of the Ergosterol Side Chain" Cameron, A.F.B., Hunt, J.S., Oughton, J.F., Wilkinson, P.A. and Wilson, B.M. (1953) *Journal of Chemical Society*, 3864-3869.
6. "Identificação de Triterpenos em Mistura" Gallegos Olea, R.S. and Roque, N. F. (1990) *Química Nova* 13, 278-281.
7. "¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids - a Compilation and Some Salient Features" Mahato, S. B. and Kundu, P. (1994) *Phytochemistry* 37, 6, 1517-1575.
8. "Triterpenes Alcohols from Camelia and Sasanqua Oils and Their Anti-inflammatory Effects" Akihisa, T., Yasukawa, K., Kimura, Y., Takase, S.-I., Yamanouchi, S. and Tamura, T. (1997) *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 45, 12, 2016-2023.
9. "Supinenolones A, B and C, Fernane Type Triterpenoids from *Euphorbia supina*" Tanaka, R. and Matsunaga, S. (1989) *Phytochemistry* 28, 3149-3154.
10. "¹³C NMR Study of Ginseng Sapogenins and Their Related Dammarane Type Triterpenes" Asakawa, J., Kasai, R., Yamasaki, K. and Tanaka, O. (1977) *Tetrahedron* 33, 1935-1939.

11. "Terpenoids from the Sonchus. VI. Tuberiferine from *Sonchus tuberifer svent.*" Bermejo Barrera, J., Bretón, J. L., Fajardo, M. and González, A. G. (1967) *Tetrahedron Letters* 36, 3475-3476.
12. Webb, G. A. (Ed.) Budesínský, M and Saman, D. (1995) Annual Reports on NMR Spectroscopy 30 , 231-475.
13. "¹³C NMR Spectra of Eudesmanolides - I - Eudesman-12,6-olides" Marco, J.A. and Carda, M. (1987) *Magnetical Resonance in Chemistry* 25, 628-634.
14. "Sesquiterpenlactone und Polyine aus der Gattung *Arctotis*" Bohlmann, F. and Van, N. L. (1977) *Phytochemistry* 16, 487-488.
15. "Identificação de componentes de Óleos Voláteis: Análise Espectroscópica de Misturas de Terpenos" Brochini, C.B, Núñez, C.V., Moreira, I.C., Roque, N.F., Chaves, M.H. and Martins, D. (1999) *Química Nova* 22, 1, 37-40.
16. "Cadabicolone, a Sesquiterpene Lactone from *Cadaba farinosa*" Ahmad, V. U., Amber, A.-U.-R., Fizza, K. and Kamal, A. (1990) *Zeitschrift für Naturforschung* 45b, 1100-1102.
17. "12-Hydroxy-*E*- γ -bisabolene, a New Sesquiterpene Alcohol from a Caribbean Sea Whip of the genus *Pseudopterogorgia* (Gorgonaceae, Cnidaria)" Look, S. A., Buchholz, K. and Fenical, W. (1984) *Experientia* 40, 931-933.
18. "Diterpenoid Acids, (-)-*cis*- and (-)-*trans*-Ozic Acid, in Wild Sunflower, *Helianthus occidentalis*" Stipanovic, R. D., O'Brien, D. H., Rogers, C. E. and Thompson, T. E. (1979) *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 27, 2, 458-459.
19. "Diterpene Acids from *Mikania triangularis*" Cruz, F. G. and Roque, N. F. (1992) *Phytochemistry* 31, 8, 2793-2796.
20. "Diterpenes from the Bark of *Juniperus chinensis*" Fang, J.-M., Sou, Y.-C., Chiu, Y.-H. and Cheng, Y.-S. (1993) *Phytochemistry* 34, 6, 1581-1584.
21. "Diterpenes from the Fruits of *Xylopia aromatica*" Moraes, M.P.L. and Roque, N.F. (1988) *Phytochemistry* 27, 10, 3205-3208.

22. "A Diterpene Related to Erythroxydiol from *Helichrysum refluxum*"
Bohlmann, F., Hartono, L. and Jakupovic, J. (1985) *Phytochemistry* 24, 3, 611-612.
23. "Tobacco Chemistry. 69*. Five New Labdanic Compounds from Tobacco"
Wahlberg, I., Eklund, A.-M., Nordfors, K., Vogt, C., Enzell, C.R. and Berg, J.-E. (1988) *Acta Chemica Scandinavica B* 42, 708-716.
24. "Antitumor Lignans and Cytotoxic Resins Acids from a New Zealand Gymnosperm, *Libocedrus plumosa*" Perry, N. B. and Foster, L. M. (1994) *Phytomedicine* 1, 233-237.
25. Análise realizada pela Dra. Anja Reltenburg-Looman, na Universidade de Lieden, Holanda.

Figura 2.1: Espectro de RMN de ^1H da fração W1.2, em CDCl_3 (300 MHz).

Figura 2.2: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W1.2, em CDCl_3 (125 MHz).

Figura 2.3: Espectro de RMN de ^1H da fração W1.3-4, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.4: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W1.3-4, em CDCl_3 (125 MHz).

Figura 2.5: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.11, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.6: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.11, em CDCl_3 (125 MHz).

Figura 2.7: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.16, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.8: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.16, em CDCl_3 (125 MHz).

Figura 2.9: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.15, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.10: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.15, em CDCl_3 (125 MHz).

Figura 2.11: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.10, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.12: Espectro de RMN de ¹³C (BBD) da fração W16.10, em CDCl₃ (125 MHz).

Figura 2.13: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.17, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.14: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.17, em CDCl_3 (125 MHz).

Figura 2.15: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.9, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.16: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.9, em CDCl_3 (125 MHz).

Figura 2.17: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.12, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.18: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W16.12, em CDCl_3 (125 MHz).

Figura 2.19: Espectro de RMN de ^1H da fração W16.19, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.20: Espectro de RMN de ¹³C (BBD) da fração W16.19, em CDCl₃ (125 MHz).

Figura 2.21: Espectro de RMN de ¹H da fração W23.2, em CDCl₃ (500 MHz).

Figura 2.22: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W23.2, em CDCl_3 (125 MHz).

Figura 2.23: Espectro de RMN de ^1H da fração W23.4, em CDCl_3 (300 MHz).

Figura 2.24: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W23.4, em CDCl_3 (75 MHz).

Figura 2.25: Espectro de RMN de ^1H da fração W5.9-10, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.26: Espectro de RMN de ^1H da fração W17.9-13, em CDCl_3 (300 MHz).

Figura 2.27: Espectro de RMN de ¹H da fração W20.7, em CDCl₃ (500 MHz).

Figura 2.28: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W20.7, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.29: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W20.7, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.30: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W20.7, em CDCl_3 (75 MHz).

Figura 2.31: Espectro de RMN de ^1H da fração W21.7, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.32: Expansão do espectro de RMN de ¹H de fração W21.7, em CDCl₃ (500 MHz).

Figura 2.33: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W21.7, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.34: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W21.7, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.35: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W21.7, em CDCl_3 (75 MHz).

Figura 2.36: Espectro de RMN de ^1H da fração W21.6, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.37: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W21.6, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.38: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W21.6, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.39: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração W21.6, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.40: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W21.6, em CDCl_3 (75 MHz).

Figura 2.41: Espectro de RMN de ^1H da fração W9.1, em CDCl_3 (300 MHz).

Figura 2.42: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração W9.1, em CDCl_3 (75 MHz).

Figura 2.43: Espectro de RMN de ^1H da fração M1.4-16, em CDCl_3 (200 MHz).

Figura 2.44: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M1.4-16, em CDCl_3 (200 MHz).

Figura 2.45: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M1.4-16, em CDCl_3 (200 MHz).

Figura 2.46: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M1.4-16, em CDCl_3 (200 MHz).

Figura 2.47: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração M1.4-16, em CDCl_3 (50 MHz).

Figura 2.48: Espectro de RMN de ^1H da fração M1.20-30, em CDCl_3 (200 MHz).

Figura 2.49: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M1.20-30, em CDCl_3 (200 MHz).

Figura 2.50: Expansão do espectro de RMN de ¹H da fração M1.20-30, em CDCl₃ (200 MHz).

Figura 2.51: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M1.20-30, em CDCl_3 (200 MHz).

Figura 2.52: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração M1.20-30, em CDCl_3 (50 MHz).

Figura 2.53: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135 $^\circ$) da fração M1.20-30, em CDCl_3 (50 MHz).

Figura 2.54: Espectro de RMN de ^1H da fração M8.2, em CDCl_3 (200 MHz).

Figura 2.55: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M8.2, em CDCl_3 (200 MHz).

Figura 2.56: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração M8.2, em CDCl_3 (50 MHz).

Figura 2.57: Espectro de RMN de ^1H da fração M8.6-8, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.58: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M8.6-8, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.59: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M8.6-8, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.60: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração M8.6-8, em CDCl_3 (125 MHz).

Figura 2.61: Espectro de RMN de ^1H da fração M8.8, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.62: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M8.8, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.63: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M8.8, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.64: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) da fração M8.8, em CDCl_3 (125 MHz).

Figura 2.65: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135 $^\circ$) da fração M8.8, em CDCl_3 (125 MHz).

Figura 2.66: Espectro de RMN de ^1H da fração M17.7-9, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.67: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M17.7-9, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.68: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M17.7-9, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.69: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração M17.7-9, em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.70: Espectro de RMN de ¹³C (BBD) da fração M17.7-9, em CDCl₃ (125 MHz).

Figura 2.71: Espectro de RMN de ^1H do óleo volátil das folhas de *Mikania* sp. nov., em CDCl_3 (500 MHz).

Figura 2.72: Espectro de RMN de ^{13}C (BBD) do óleo volátil das folhas de *Mikania* sp. nov., em CDCl_3 (125 MHz).

Figura 2.73: Cromatograma a gás do óleo volátil das folhas de *Mikania* sp. nov.

Figura 2.74: Cromatograma a gás do óleo volátil dos galhos de *Mikania* sp. nov.

CAPÍTULO 3:

ESTUDOS BIOLÓGICOS

3.1 INTRODUÇÃO

Os organismos vivos, e em particular os microorganismos, estão em constante evolução e adaptação ao meio ambiente. Por mais eficiente que seja um medicamento desenvolvido contra determinado microorganismo, este pode sofrer mutações tornando-se resistente ao mesmo. Por isso há uma preocupação constante em buscar novas substâncias ativas contra esses organismos patógenos. Neste sentido, as plantas são uma fonte delas. Um fator limitante na busca de substâncias ativas é a toxicidade. Muitas vezes, obtêm-se resultados interessantes de atividades biológicas, mas as substâncias são tóxicas o que as impedem de tornarem-se medicamentos. Um dos requisitos necessários para que a substância possa seguir a rota até se tornar um medicamento, é a seletividade da atividade, ou seja, apenas atuar sobre as células do parasita (vírus, bactérias, etc.) ou sobre as células tumorais, entre outras, e não atingir células humanas sadias.

Uma nova tendência mundial do estudo fitoquímico é o estudo químico biomonitorado. Nesse sentido, diversos estudos estão sendo feitos e há boa bibliografia a respeito¹⁻³. Esta tendência consiste em estudar os extratos que apresentem maior bioatividade monitorando o fracionamento por testes para localizar as frações portadoras desse efeito. Desta forma o estudo é dirigido apenas para o isolamento de substâncias ativas, podendo-se com isto perder a descoberta de novas substâncias apenas por não serem ativas num determinado bioensaio. Esse tipo de biomonitoramento requer que o bio-ensaio seja rápido, sensível, seletivo e barato. Em casos onde o ensaio biológico dura uma semana, ou mais, torna-se inviável realizar o biomonitoramento de todas as frações. Nestes casos, opta-se por testar apenas o extrato bruto e as substâncias isoladas. Um ponto a ser ressaltado é a colaboração que deve existir entre o grupo de

fitoquímicos e o que realiza o bioensaio. Esta colaboração é fundamental para agilizar o processo de isolamento da substância bioativa.

Desde o princípio, o projeto desta tese esteve relacionado à busca de substâncias bioativas. Foi iniciado o estudo de um espécimen de *Mikania sp.*, outra espécie nova, também coletada no Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia. Nesse trabalho, estudamos o extrato diclorometânico dos galhos e chegamos a uma fração com atividade anti-malária bem significativa (5 µg/mL apresentaram 100% de inibição de *Plasmodium falciparum* em 72 horas)^{4,5}. Porém, no decorrer do trabalho foi observada uma grande dificuldade no isolamento das substâncias (2.7.1). Isto deveu-se, provavelmente, ao fato de ter ocorrido degradação de aldeídos diterpênicos presentes no extrato, que ao degradarem-se promovem a decomposição de outras substâncias presentes no extrato. Retornamos ao local da coleta inicial, contudo não encontramos mais aquela espécie de *Mikania*. Uma hipótese, para este fato, é a de tenha havido uma seca muito forte na região e a espécie não resistiu. A região da Chapada Diamantina onde ocorre a espécie é tropical, com os meses de seca e de chuva bem definidos. Como não pudemos coletar aquela espécie de *Mikania*, coletamos outra encontrada no mesmo Morro do Pai Inácio e um espécimen de *Wunderlichia crulsiana* também encontrado próximo. Os extratos obtidos destas plantas foram submetidos ao ensaio antifúngico e algumas frações de *W. crulsiana* foram testadas como anti-inflamatórias e contra *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados obtidos estão descritos neste capítulo. Os estudos para constatar a atividade contra malária foram suspensos em função da mudança do pesquisador responsável pelos bioensaios.

ENSAIO ANTIFÚNGICO

O ensaio antifúngico é um dos testes efetuados com maior frequência em função de sua facilidade. Porém, ele não é seletivo, ou seja, qualquer substância citotóxica será ativa. O ensaio realizado pela Dra. Maria Claudia Marx Young, no Instituto de Botânica da SMA, foi realizado sobre um tipo de fungo fitopatígeno, o *Cladosporium sphaerospermum*.

ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO

Existem vários modelos descritos na literatura para medir a atividade anti-inflamatória de substâncias. Entre eles podemos citar:

- Redução do edema de orelha^{6,7} e de pata⁸ de camundongo. Nestes ensaios necessita-se de uma substância que provoque a inflamação e para esse fim utiliza-se 12-*O*-tetradecanoil-13-acetato de forbila (TPA)¹ ou 12-miristitato-13-acetato de 4 β -forbila (PMA)⁷;
- Inativação do fator de transcrição NF-kappa B⁹, o qual é o mediador central na resposta imunológica humana. Esse ensaio seria o mais geral para respostas inflamatórias;
- Medida da liberação do ânion superóxido (O₂)¹⁰. Este foi o ensaio realizado a fim de determinar a atividade anti-inflamatória dos triterpenos e das lactonas sesquiterpênicas isoladas do extrato diclorometânico dos galhos de *Wunderlichia crulsiana*. O ensaio foi realizado pela Profa. Ms. Maisa R. P. L. Brigagão e pela sua aluna de IC Fabiola Zacheu, ambas da Universidade Federal de Alfenas - MG.

ENSAIO ANTITUMORAL

O câncer é uma doença que atinge uma porcentagem considerável da população mundial, principalmente nos países desenvolvidos. Por esta razão, diversos bioensaios foram desenvolvidos para encontrar substâncias ativas¹¹. O ensaio utilizado pela Dra. Maria Claudia Marx Young, no Instituto de Botânica da SMA é com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os fungos são preferidos às bactérias por serem genética e bioquimicamente semelhantes às células dos mamíferos. O ensaio realizado baseia-se no princípio de que as células tumorais não conseguem reparar danos existentes no DNA. Assim, foram preparadas por alteração genética duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* denominadas 524 e 321 deficientes no reparo do DNA. A linhagem rad⁺ equivale às células sadias e consegue reparar o seu DNA.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

ENSAIO ANTIFÚNGICO

O ensaio antifúngico realizado é simples e rápido. Consiste em aplicar a substância ou o extrato em uma placa cromatográfica, eluí-la se for necessário, e borrifar a placa com a solução contendo os esporos do fungo em um meio de cultura. Deixa-se essa placa em um local escuro e a 25 °C por 48 horas. Após esse período, observa-se a formação de halos de inibição nos locais nos quais houver alguma substância ativa¹².

ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO

O ensaio de medida da liberação do ânion superóxido (O_2^-) baseia-se no fato de que quando ocorre a inflamação o organismo libera neutrófilos e macrófagos, células fagocitárias, que ao serem ativadas pela presença de inflamação liberam O_2^- . A ativação é feita injetando intraperitonealmente em camundongos, anestesiados com éter etílico, 1 mL de solução estéril de caseinato de sódio a 12 %. A descrição completa de processo está na referência 5. A obtenção de neutrófilos ou macrófagos depende do tempo durante o qual a solução de caseinato de sódio age sobre o camundongo. Se o tempo for de 4 horas obtêm-se neutrófilos, se for de 12 horas serão obtidos macrófagos⁵.

A determinação da liberação de O_2^- por neutrófilos e macrófagos foi realizada incubando 1×10^6 células/mL, coletadas da cavidade peritoneal dos camundongos, com 0,75 mM de citocromo c por quinze minutos a 37 °C em cubeta plástica. Após esse tempo de incubação foram adicionados 200 ng/mL de 12-miristitato-13-acetato de 4 β -forbol (PMA), dissolvido em DMSO, a fim de desencadear a produção de O_2^- (controle). A redução contínua do citocromo c, indicador da reação, foi acompanhada em espectrofotômetro pela mudança de absorbância a 550 nm, sendo a produção de O_2^- calculada com base na velocidade máxima dos primeiros 60 segundos de reação. Para saber se a substância apresenta atividade, 50 ou 100 mL de solução da substância (conc. 0,07 mg por 50 mL) foram incubados junto com as células e o citocromo c¹⁰.

ENSAIO ANTITUMORAL

As amostras, dissolvidas em DMSO/MeOH 1:1, foram aplicadas na cavidade da placa que continha uma das três linhagens. Essa proporção de solventes é a ideal, porque maior concentração de DMSO inibe o crescimento do fungo e maior concentração de MeOH provoca difusão e a solução amostra/solvente não permanece no orifício. O objetivo do ensaio é medir o quanto uma amostra consegue inibir o crescimento das linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Uma determinada amostra é considerada positiva se exibir, após período de incubação de 48 horas a 30 °C, uma zona de inibição de crescimento do fungo maior de 12 mm ao redor do local onde a amostra foi aplicada.

3.3 RESULTADOS

ENSAIO ANTIFÚNGICO

Os resultados obtidos com os extratos brutos testados contra *Cladosporium sphaerospermum* não foram muito animadores. O resultado mais satisfatório foi com o extrato diclorometânico dos galhos de *Wunderlichia crulsiana*. O extrato diclorometânico das flores apresentou atividade menos intensa (figura 3.1). Os extratos metanólicos das duas plantas foram testados e não apresentaram atividade.

As frações contendo os triterpenos e as lactonas sesquiterpênicas foram testadas e não apresentaram atividade.

sendo:

1	2	3	4
1 = Extrato diclorometânico das flores de <i>W. crulsiana</i> .	2 = Extrato diclorometânico dos galhos de <i>W. crulsiana</i> .	3 = Extrato diclorometânico das folhas de <i>Mikania</i> sp. nov.	4 = Extrato diclorometânico dos galhos de <i>Mikania</i> sp. nov.

Ensaio realizado com 500 µg de extrato. Sistema de eluição: DCM/MeOH 96:4.

Figura 3.1: Ensaio anti-fúngico realizado com extratos de *W. crulsiana* e *Mikania* sp. nov.

ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO

Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 3.1. Pode-se observar que as lactonas sesquiterpênicas foram bastante ativas (47% de inibição). A fração testada foi a W 17.9-13 (seção 2.6.3) proveniente do fracionamento do extrato diclorometânico dos galhos de *W. crulsiana*. Esta fração contém a mistura das lactonas sesquiterpênicas. Estamos aguardando o resultado do ensaio com as lactonas isoladas para determinar qual(is) apresenta(m) atividade.

Tabela 3.1: Resultados obtidos com o ensaio anti-inflamatório.

Frações testadas	Inibição (%)
Lactonas sesquiterpênicas	47
triterpenos pentacíclicos hidroxilados	42
triterpenos pentacíclicos esterificados com acetato	29
triterpenos pentacíclicos esterificados com ácidos graxos	29

ENSAIO ANTITUMORAL

As amostras foram testadas e os resultados obtidos estão na tabela 3.2. O extrato diclorometânico das flores de *Wunderlichia crulsiana* apresentou a mesma atividade com duas linhagens, das quais a rad + é a sadia, portanto essa atividade não é interessante. O extrato diclorometânico das folhas de *Mikania* sp. nov. apresentou 10 mm de diâmetro do halo de inibição, como o padrão de atividade para esse ensaio é um halo de 12 mm, está abaixo do considerado ativo para o fracionamento biomonitorado. A fração W17.9-13 não apresentou atividade, o que é um bom indício de que as lactonas sesquiterpênicas não sejam citotóxicas.

Tabela 3.2: Resultados obtidos com o ensaio antitumoral.

Amostras	rad +	321	52Y
<i>W. crulsiana</i>			
Extrato diclorometânico dos galhos	-	-	-
Extrato metanólico dos galhos	-	-	-
Extrato metanólico das folhas	-	-	-
Extrato diclorometânico das flores	10 mm	10 mm	-
W5.1	-	-	-
W5.2	-	-	-
W17.9-13	-	-	-
<i>Mikania</i> sp. nov.			
Extrato diclorometânico das folhas	-	10 mm	-
Extrato diclorometânico dos galhos	-	-	-
Extrato metanólico dos galhos	-	-	-
Óleo volátil das folhas	-	-	-

3.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são preliminares porém indicaram uma boa atividade anti-inflamatória das lactonas sesquiterpênicas. Como não foram ativas contra *Saccharomyces cerevisiae*, há um indício de que não sejam citotóxicas. Outros estudos estão sendo realizados a fim de encontrar qual(is) lactona(s) sesquiterpênica(s) é(são) responsável(is) pela atividade, além de ensaios para determinar a rota bioquímica na qual atua(m).

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. "Changing Strategies in Natural Products Chemistry" Cordell, G. A. (1995) *Phytochemistry* 40, 6, 1585-1612.
2. "Search for New Antifungal Compounds from Higher Plants" Hostettmann, K. and Marston, A. (1994) *Pure and Applied Chemistry* 66, 10/11, 2231-2234.
3. "Rapid Detections and Subsequent Isolation of Bioactive Constituents of Crude Plants Extracts" Hostettmann, K., Wolfender, J.-L. and Rodriguez, S. (1997) *Planta Medica* 63, 2-10.
4. "Effect of Terpenes in Cultures of *Plasmodium falciparum*" Planchart Rojas, A., Núñez, C. V., Franca Roque, N., Kimura, E. A. and Katzin, A., (setembro/1997) Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Proceedings, Rio de Janeiro, 92, 1, 19.
5. "Fracionamento Biomonitorado por Cultura de *Plasmodium falciparum* do Extrato Diclorometânico dos galhos de *Mikania sp.*" (maio/1998) Núñez, C. V., Rojas, A. P., Cruz, F., Katzin, A. e Roque, N. F., 21ª RA da SBQ, Poços de Caldas.
6. "Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects" Akihisa, T., Yasukawa, K., Oinuma, H., Kasahara, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaki, K. and Tamura, T. (1996) *Phytochemistry* 43, 6, 1255-1260.
7. "Inhibition by hydroxyachillin, sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum*, of PMA-induced mouse ear oedema" Silvan, A.M., Abad, M.J. and Villar, A. (1996) *Inflammation Research* 45, 6, 289-292.
8. "Anti-Inflammatory activity of *Aglaia roxburghiana* var. *beddomei* extract and triterpenes roxburghiadiol A and B" Janaki, S., Vijayasekaran, V., Viswanathan, S. and Balakrishna, K. (1999) *Journal of Ethnopharmacology* 67, 45-51.

9. "Inhibition of NOS-2 expression in macrophages through the inactivation of NF-kappa B by andalusol" de las Heras B. Navarro, A., Diaz-Guerra, M.J., Bermejo, P. Castrillo, A., Bosca, L. and Villar, A., (1999) *British Journal of Pharmacology* 128, 3, 605-612.
10. Brigagão, M.R.P.L. (1996) Oscilação Circadiana na Liberação de Ânion Superóxido por Leucócitos Polimorfonucleares e sua Modulação pela Saliva Humana, Dissertação de Mestrado, IQ-USP.
11. Brochini, C.B. (1997) Terpenos de *Guarea guidonia* (Meliaceae) e Fracionamento de Extratos Vegetais Biomonitorado por Linhagens Mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, Tese de Doutorado, IQ-USP.
12. "Direct Bioautography on Thin-Layer Chromatograms as a Method for Detecting fungitoxic substances" Homans A.L. and Funchs, A. (1970) *J. Chromatog.* 51, 327-329.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico das plantas *Wunderlichia crulsiana* e *Mikania* sp. nov. resultou no isolamento e identificação das seguintes substâncias:

Plantas Estudadas	Substâncias Identificadas
<i>Wunderlichia crulsiana</i>	
Flores	1 a 4
Galhos	1 a 19
<i>Mikania</i> sp. nov.	
Folhas	20 a 27
Galhos	20 e 21

Do ponto de vista do conhecimento dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas, o estudo de *W. crulsiana*, embora não tenha sido exaustivo, nem tendo resultado no isolamento de substâncias com estruturas químicas diferenciadas, trouxe uma contribuição para o conhecimento das espécies do gênero ainda pouco estudado.

Quanto à contribuição para a quimiotaxonomia das espécies do gênero *Mikania*, a presença dos ácidos diterpênicos coloca a espécie em questão ao lado das produtoras de diterpenos e não das de lactonas sesquiterpênicas. Embora o gênero *Mikania* seja de fácil identificação, suas espécies são dificilmente distinguíveis e o estudo químico pode, sem dúvida, auxiliar na distinção entre elas.

Os trabalhos de isolamento e identificação das substâncias extraídas de espécimens de *W. crulsiana* e *Mikania* sp. vieram ressaltar a importância da associação de várias técnicas na análise de substâncias com estruturas muito parecidas. O resultado alcançado deveu-se, em grande parte, ao emprego da CG

como auxiliar no acompanhamento das análises por RMN de ^{13}C . Esta cromatografia dá um diagnóstico mais preciso do que a CCDC quanto à complexidade da mistura. Além desta, na ausência da espectrometria de massas dá uma indicação quanto à massa da molécula, uma vez que pelo tempo de retenção pode-se inferir qual o número de átomos presente na molécula.

CURRICULUM VITAE

Nome: Cecilia Veronica Núñez.

Local e Data de Nascimento: Buenos Aires, Argentina, 06/12/1971.

EDUCAÇÃO

Colégio "Campos Salles"

Local: Lapa, São Paulo.

Período: 1986 a 1988.

Universidade Mackenzie.

Local: Higienópolis, São Paulo.

Período: agosto de 1989 a junho de 1993.

Bacharelado em Química.

Universidade de São Paulo.

Período: agosto de 1993 a abril de 1996.

Mestrado em Química Orgânica.

Título da Dissertação: "Sesquiterpenos e Esteróides da Casca do Tronco de *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae)"

Universidade de São Paulo.

Período: maio de 1996 a maio de 2000.

Doutor em Química Orgânica.

Estágio realizado durante o Doutorado: De 04 de setembro a 11 de dezembro de 1997 foi realizado um estágio na Université de Lausanne, Suíça, com o Prof. Dr. Kurt Hostettmann.

OCUPAÇÕES

Iniciação Científica.

IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

Período: abril de 1991 a março de 1992.

Estagiária Química.

Colgate-Palmolive, São Paulo.

Período: agosto de 1992 a março de 1993.

Bolsista do CNPq durante o Mestrado.

Bolsista da FAPESP durante o Doutorado.

PUBLICAÇÕES

1. "Sesquiterpenes, Limonoid and Coumarin from the Wood Bark of *Guarea guidonia*" Garcez, F. R., Núñez, C. V., Garcez, W., Almeida, R. and Roque, N. F., *Planta Medica* 64, 79-80 (1998).
2. "Terpenes of *Mikania* sp. (Asteraceae)" Núñez, C. V. and Roque, N. F., *Acta Horticulturae, Proceedings WOCMAP II* 2 (no prelo).
3. "Identificação de Componentes de Óleos Voláteis: Análise Espectroscópica de Misturas de Sesquiterpenos" Brochini, C. B., Núñez, C. V., Moreira, I. C., Roque, N. F., Chaves, M. H. and Martins, D. *Química Nova* 22, 1, 37-40 (1999).
4. "Sesquiterpenes from the Stem Bark of *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae)" Núñez, C. V. and Roque, N. F. *Journal of Essential Oil Research* 11, 439-440 (1999).
5. "¹³C NMR Spectroscopy of Eudemanes" Oliveira, F.C, Ferreira, M.J.P., Núñez, C.V., Rodriguez, G.V., Emerenciano, V.P., NMR Spectroscopy, (no prelo).